

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Željka Bajan

OKSIDACIJSKI STRES U BILJKAMA DUHANA (*Nicotiana tabacum* L.)  
IZLOŽENIM NANOČESTICAMA SREBRA

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Biljane Balen, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

*Zahvaljujem se, u prvom redu, svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Biljani Balen na utrošenom vremenu, strpljenju, pomoći, savjetima i srdačnom pristupu tijekom izrade ovoga diplomskog rada. Uz to, zahvaljujem se i dr. sc. Petri Cvjetko na svojoj pomoći, razumijevanju i ukazanom povjerenju prilikom provođenja ovog istraživanja.*

*Zahvaljujem se također izv. prof. dr. sc. Ana-Mariji Domijan i izv. prof. dr. sc. Mirti Tkalec na stručnoj pomoći oko provođenja dijela istraživanja koje su upotpunile ovaj rad.*

*Također zahvaljujem se svim kolegicama u laboratoriju koje su uvijek bile uz mene i svojom su prisutnošću, društvom i savjetima rad učinile lakim i zabavnim.*

*Posebno se zahvaljujem svojim prijateljima i prijateljicama, koji su uvijek bili uz mene i bili mi potpora i poticaj te mi učinili ovaj tijek studiranja lakšim i zabavnijim.*

*I na kraju, najveću zaslugu za ono što sam postigla pripisujem svojim roditeljima, bratu, bakama i djedu, koji su uvijek bili tu, uz mene, bez obzira je li se radilo o teškim ili sretnim trenucima i bez kojih sve ovo što sam dosad postigla ne bi bilo moguće.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

## OKSIDACIJSKI STRES U BILJKAMA DUHANA (*Nicotiana tabacum* L.) IZLOŽENIM NANOČESTICAMA SREBRA

Željka Bajan  
Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Nanočestice srebra (AgNP) dominiraju među vrstama dostupnih nanomaterijala zbog dobro poznatog protubakterijskog i protugljivičnog učinka srebra. Stoga se danas intenzivno ispituje njihov učinak na okoliš i žive organizme. U ovom radu je istražen utjecaj AgNP na pojavu oksidacijskog stresa u odraslim biljkama duhana (*Nicotiana tabacum* L.), a učinci nanosrebra uspoređeni su s učinkom ionskog srebra ( $\text{AgNO}_3$ ) istih koncentracija. Tretmani s AgNP nisu izazvali pojavu oksidacijskog stresa u korijenu i listu duhana jer nije zabilježena promjena u sadržaju reaktivnih oblika kisika (ROS), malondialdehida, proteinskih karbonila i oštećenju molekule DNA. Oksidacijski stres zabilježen je nakon tretmana biljaka s  $\text{AgNO}_3$  u korijenu prema svim ispitanim parametrima, a u listu prema većini parametara, što je bilo osobito izraženo pri najvećim ispitanim koncentracijama. Veće promjene u aktivnosti i ekspresiji antioksidacijskih enzima SOD, PPX, APX i CAT izmjerene su u korijenju i listovima duhana nakon izlaganja tretmanima s  $\text{AgNO}_3$  u odnosu na AgNP. Ionsko srebro pokazalo se toksičnije za biljke duhana od nanosrebra, a jači učinci zabilježeni su u korijenju u odnosu na listove.

(77 stranica, 40 slika, 3 tablice, 77 literaturnih navoda, jezik izvornik: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: reaktivni oblici kisika, lipidna peroksidacija, proteinski karbonili, oštećenje DNA, antioksidacijski enzimi

Voditelj: dr. sc. Biljana Balen, izv. prof.

Neposredni voditelj: dr. sc. Petra Cvjetko

Ocjenitelji: dr. sc. Biljana Balen, izv. prof.; dr. sc. Ines Radanović, izv. prof.; dr. sc. Vesna Petrović Peroković, izv. prof.

Rad prihvaćen: 02.02.2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

### OXIDATIVE STRESS IN TOBACCO PLANTS (*Nicotiana tabacum* L.) EXPOSED TO SILVER NANOPARTICLES

Željka Bajan

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Silver nanoparticles (AgNP) dominate among the types of available nanomaterials because of the well-known antibacterial and antifungal effects of silver. Therefore, their impact on the environment and living organisms intensively studied. This diploma thesis investigates the impact of AgNPs on the appearance of oxidative stress in adult tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). The effects of nanosilver are compared with the effects of ionic silver ( $\text{AgNO}_3$ ), applied in the same concentration. AgNPs didn't induce oxidative stress since no changes were recorded in the content of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde, protein carbonyls and DNA damage in the roots and leaves of tobacco plants. However oxidative stress was recorded after the  $\text{AgNO}_3$  treatments, in the roots according to all tested parameters, and in the leaves according to majority of investigated parameters, which was particularly pronounced at the highest applied concentrations. Greater changes in the activity and expression of antioxidant enzymes SOD, PPX, APX and CAT were measured in the roots and leaves of tobacco after exposure to treatments with  $\text{AgNO}_3$  in relation to AgNP. Ionic silver proved to be more toxic to the tobacco plants compared to nanosilver and its stronger effects have been found in the roots compared to the leaves.

( 77 pages, 40 figures, 3 tables, 77 references, original in: Croatian language)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: reactive oxygen species, lipid peroxidation, protein carbonyls, DNA damage, antioxidative enzymes

Supervisor: Dr. Biljana Balen, Assoc. Prof.

Cosupervisor: Dr. Petra Cvjetko

Reviewers: dr. sc. Biljana Balen, izv. prof.; dr. sc. Ines Radanović, izv. prof.; dr. sc. Vesna Petrović Peroković, izv. prof.

Thesis accepted: 02.02.2017

## **POPIS KRATICA I SIMBOLA**

AA – akrilamid

AgNP – nanočestice srebra

APS – amonijev persulfat

APX – askorbat peroksidaza

BFB – bromfenol plavo

Bis – N,N'-metilen-bis-akrilamid

BSA – goveđi serumski albumin

CAT – katalaza

CBB – Comassie Brilliant Blue

DHE – dihidroetidij

DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazin

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

HRP – peroksidaza iz hrena

MDA – malondialdehid

NBT – nitroblue tetrazolium

PAGE – poliakrilamid gel elektroforeza

PBS – puferirana otopina fosfatnih soli

PPX – pirogalol peroksidaza

PVP – polivinilpirolidon

ROS – reaktivni oblici kisika

rpm – okretaji u minuti

SDS – natrijev dodecil sulfat

SOD – superoksid dismutaza

TBA – tiobarbituratna kiselina

TBS – Tris pufer

TCA – trikloroctena kiselina

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletildiamin

Tris – 2-amino-2hidroksimetil-propan-1,3-diol

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Nanomaterijali .....	1
1.1.2. Nanočestice srebra.....	1
1.2. Oksidacijski stres .....	2
1.2.1. Lipidna peroksidacija .....	3
1.2.2. Oksidacija proteina .....	3
1.2.3. Oštećenje DNA.....	4
1.2.4. Antioksidacijski enzimi .....	4
1.3. Duhan ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.) kao modelni organizam .....	6
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	8
3. MATERIJAL I METODE .....	10
3.1. Metode.....	10
3.1.1. Nanočestice srebra (AgNP) .....	10
3.1.2. Biljni materijal .....	10
3.2. Metode .....	10
3.2.1. Ekstrakcija ukupnih topivih proteina.....	10
3.2.2. Određivanje koncentracije proteina.....	11
3.2.3. Dihidroetidij test.....	11
3.2.4. Ekstrakcija lipida i određivanje sadržaja malondialdehida.....	11
3.2.5. Određivanje sadržaja proteinskih karbonila .....	12
3.2.6. Comet test .....	13
3.2.7. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima .....	13
3.2.8. Razdvajanje proteina nativnom poliakrilamid gel elektroforezom .....	16
3.2.9. Analiza ekspresije ukupnih proteina razdvajanjem natrijev dodecil sulfat- poliakrilamid gel elektroforezom (SDS-PAGE).....	18
3.2.10. Imunodetekcija proteina na membrani .....	19
3.3 Statistička obrada podataka .....	22
4. REZULTATI.....	24
4.1. Dihidroetidij test .....	24
4.2. Sadržaj MDA.....	30
4.3. Sadržaj proteinskih karbonila .....	32
4.4. Comet test .....	34
4.5. Aktivnost antioksidacijskih enzima .....	36
4.5.1. Aktivnost superoksid dismutaze.....	36
4.5.2. Aktivnost pirogalol peroksidaze .....	38

4.5.3. Aktivnost askorbat peroksidaze .....	40
4.5.4. Aktivnost katalaze.....	42
4.6. Aktivnost antioksidacijskih enzima u gelu .....	44
4.6.1. Aktivnost superoksid dismutaze.....	44
4.6.2. Aktivnost pirogallol peroksidaze .....	45
4.6.3. Aktivnost askorbat peroksidaze .....	47
4.6.4. Aktivnost katalaze.....	49
4.7. Ekspresija ukupnih proteina .....	51
4.8. Imunodetekcija antioksidacijskih enzima .....	56
4.8.1. Superoksid dismutaza .....	56
4.8.2. Peroksidaza iz hrena .....	57
4.8.3. Askorbat peroksidaza .....	59
4.8.4. Katalaza .....	60
5. RASPRAVA.....	63
6. ZAKLJUČAK.....	70
7. POPIS LITERATURE .....	72





**UVOD**

# 1. UVOD

## 1.1. Nanomaterijali

U današnje vrijeme tehnologija se brzo razvija, tako je danas jedna od najpopularnijih i najrazvijenijih tehnologija - nanotehnologija. Kada bi pogledali u prošlost, prefiks „nano“ prvi put se pojavio 1959. godine na predavanju „Ima dovoljno prostora na dnu“ fizičara Richarda Feynmana (Mijović, 2015). Nanotehnologija razvija i istražuje nova svojstva materijala, sustava i uređaja s barem jednom dimenzijom na nanoskali od 1 do 100 nm. Prefiks „nano“ sadrže pojmovi kao što su: nanostrukture, nanomaterijali, nanočestice, nanovlakna itd. (Mijović, 2015; Tran i sur., 2013).

Nanomaterijali se danas upotrebljavaju i „popularni“ su zbog svojih jedinstvenih svojstava u odnosu na svoje makromaterijale. Široku primjenu osim u medicini, pronašli su u električnoj, prehrambenoj i kemijskoj industriji zbog svojih fizičkih, kemijskih, elektroničkih, bioloških i optičkih svojstava (Tran i sur., 2013). Godine 2007., Ujedinjeni narodi izvjestili su kako tadašnjih 0,1% svjetske ekonomije pripada nanotehnologiji, te da će 2014. godine nanotehnologija zauzimati 14% svjetske ekonomije (Sellers i sur., 2009). Razvojem nanotehnologije nametnulo se i pitanje kakve rizike nosi sve češća upotreba nanomaterijala na okoliš i žive organizme. Takvi proizvodi mogu putem hrane ili konzumiranjem biljnih preparata dospjeti u ljudski organizam, no ljudi mogu biti izloženi nanočesticama i na izravan način jer se one nalaze u zraku, vodi i tlu (Nowack i sur., 2007). Zadnjih godina, uz porast upotrebe nanomaterijala, raste i broj istraživanja kojima se želi doći do odgovora na pitanje ima li primjena nanomaterijala štetne posljedice na okoliš i žive organizme (Sellers i sur., 2009; Aslani i sur., 2014)

U Danskoj, proizvodi koji sadrže nanomaterijale ili u imenu sadrže prefiks „nano“, uvršteni su u bazu podataka. U bazi se danas trenutno nalazi 2330 proizvoda. Svaki proizvod je kategoriziran kodom koji se sastoji od pet točkica određene boje, ovisno o riziku koji dotični nanomaterijal predstavlja za ljude i okoliš (*the Danish Consumer Council, Nanodatabase*, 2011).

### 1.1.2. Nanočestice srebra

Nanočestice srebra (AgNP) dominiraju među vrstama dostupnih nanomaterijala zbog dobro poznatog protubakterijskog i protugljivičnog učinka srebra (Tran i sur., 2013). Zbog toga se često koriste u poljoprivredi kao dodatak pesticidima i umjetnim gnojivima, a imaju široku primjenu i u industriji (npr. prehrambena, kemijska i elektronička industrija) i znanosti (npr. fizika i kemija).

Srebro su ljudi upotrebljavali tisućama godina za sprječavanje infekcija, liječenje akni, zacjeljivanje rana itd. Danas se zbog povećane rezistencije opasnih bakterija na antibiotike srebro upotrebljava kao protubakterijsko sredstvo. Ono djeluje kao antibiotici širokog spektra, a pritom je smanjena rezistentnost bakterijskog organizma (Landsdown, 2002). Mnoge bakterije danas ubrzano razvijaju rezistenciju na antibiotike, stoga je vrlo važna spoznaja da upotreba srebra kao protubakterijskog sredstva smanjuje njihovu rezistentnost.

Nanočestice srebra pokazale su se toksičnije za bakterije u odnosu na ionsko srebro. Razlog veće toksičnosti leži u činjenici da je u nanostrukтури važan omjer veličine čestice i volumena, jer što je čestica manja, to je veći omjer, što dovodi do veće reaktivnosti nanočestice.

Godine 2012. laboratorijski je dokazan protubakterijski učinak nanosrebra na bakterije *Staphylococcus aureus*, otporne na meticilin, koje su bile nasađene na gel koji je u sebi sadržavao nanosrebro (Seltenrich, 2013). Nadalje, Salopek-Sondi i Sondi (2004) sa Instituta Ruđer Bošković utvrdili su postojanje protubakterijskog učinka nanočestica srebra na bakteriju *E. coli*. Iako nanočestice srebra danas imaju široku primjenu i uporabu, one su slabo istraženi materijal.

## 1.2. Oksidacijski stres

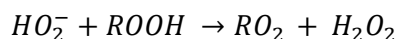
Biljke rastu na određenom staništu, vezane su za njega i tijekom godina su razvile određene prilagodbe kojima se bore protiv promjena u okolišu. Kao posljedica promijenjenih tj. stresnih uvjeta rasta, u biljnom organizmu vrlo često dolazi do pojave oksidacijskog stresa (Arora i sur., 2002). Oksidacijski stres je pojava neravnoteže oksidansa i antioksidansa u smjeru stvaranja oksidansa, što uzrokuje oštećenja biološki važnih makromolekula stanici (Inzé i Montagu, 2003). Oksidansi nastaju u biljnoj stanici procesom aerobnog metabolizma, kao međuprodukti oksidacije vode do molekularnog kisika u fotosintetskom transportnom lancu elektrona (Inzé i Montagu, 2003; Arora i sur., 2002). Pojava oksidacijskog stresa u biljci može biti izazvana različitim abiotičkim čimbenicima kao što su suša, povišeni salinitet, povišena ili snižena temperatura, teški metali itd. (Balen i sur. 2011a; Cvjetko i sur. 2014; Rogić i sur. 2015). U takvim uvjetima dolazi do pojačanog stvaranja reaktivnih oblika kisika (ROS) koji uzrokuju oštećenja lipida, proteina i molekule DNA, te na taj način nepovoljno utječu na rast i metabolizam stanice (Mithöfer i sur., 2004). ROS mogu biti slobodni radikali kao što su hidroksilni ( $\text{OH}^\cdot$ ), peroksilni ( $\text{RO}_2^\cdot$ ), superoksidni ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) ili reaktivni neradikalni derivati kao singletni kisik ( $^1\text{O}_2$ ) i vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Sies, 1985).

Biljke posjeduju visoko učinkovit sustav antioksidacijskih enzima, kao što su: superoksid-dismutaza (SOD), askorbat peroksidaza (APX) i pirogalol peroksidaza (PPX) te

katalaza (CAT), koji kontrolira stvaranje ROS-a i štiti biljne stanice smanjenjem razine oksidacijskog stresa (Mittler, 2002). Osim spomenutih antioksidacijskih enzima održavanje razine ROS-a i prevenciju oksidacijskih oštećenja stanice sprječavaju i neenzimski antioksidansi kao što su: prolin, glutation, askorbinska kiselina, tokoferol, karotenoidi i flavonoidi. Antioksidansi su definirani kao tvari koje usporavaju ili u potpunosti inhibiraju oksidaciju supstrata, kada se u stanici nalaze u nižim koncentracijama od supstrata podložnog oksidaciji (Halliwell i Gutteridge, 1989).

### 1.2.1. Lipidna peroksidacija

Stanične membrane izgrađuju višestruko nezasićene masne kiseline, mete slobodnih radikala koji nastaju pri pojavi oksidacijskog stresa. Pojava koja je rezultat tih „napada“ je lipidna peroksidacija i ona utječe na fiziološko funkcioniranje stanice (Labudda, 2013). Oštećenje koje je nastalo pojavom lipidne peroksidacije određuje se mjerenjem količine nekih od krajnjih produkata tog procesa. Najčešće se mjeri količina nastalog malondialdehida (MDA) kao i 4-hidroksinonenala (HNE) te izoprostana. Malondialdehid se detektira reakcijom s tiobarbituratnom kiselinom (TBA), s kojom formira obojene produkte nazvane tiobarbiturne reaktivne supstance (TBARS). Sadržaj MDA je mjerljivi parametar kojeg određujemo spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 532 nm (Heath i Packer, 1968). Lipidna peroksidacija i nastanak malondialdehida utječu na svojstva membrana: djeluju na transport iona i izmjenu fosfolipida između dvosloja lipida, smanjuju fluidnost membrane i povećavaju propusnost membrane za neke tvari koje prije oksidacijskog stresa kroz membranu nisu mogle proći (Gill i Tuteja, 2010). Prva faza lipidne peroksidacije zove se inicijacija i u njoj nastaju radikali masnih kiselina. Postoje još dvije faze lipidne peroksidacije, a to su propagacija i terminacija. U daljnju fazu, a to je propagacija mogu ići produkti inicijacije, a to su hidroperoksidni radikali. Lipidnu peroksidaciju najčešće započinje hidroperoksidni radikal ( $HO_2^{\cdot}$ ) prema reakciji:



Metilenska skupina gubi atom vodika i tako nastaju lipidni radikali, koji mogu dalje ići u fazu propagacije. Razgradnjom lipidnih hidroperoksida (LOOH) nakupljaju se produkti peroksidacije (aldehidi i ugljikovodici) (Labudda, 2013).

### 1.2.2. Oksidacija proteina

Određivanjem količine proteinskih karbonila mjeri se razina oksidacije proteina. Oksidacija proteina je kovalentna modifikacija proteina tj. amino kiselina, inicirana reaktivnim oblicima kisika ili oksidacijskim stresom, što daje slobodnu karbonilnu skupinu, inhibirajući

aktivnost proteina. Aminokiselinski lanci proteina se oksidiraju i stvaraju se karbonilne skupine (ketoni ili aldehidi) (Gill i Tuteja, 2010). Karbonili mogu nastati oksidacijom aminokiselinskih lanaca (posebno prolina, lizina, arginina i treonina), ali i oksidacijskim cijepanjem polipeptida i vezanjem aldehida nastalih u lipidnoj peroksidaciji. Proteinski karbonili su stabilni i detektiraju se u reakciji s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) pri čemu nastaje dinitrofenil hidrazon kojeg možemo odrediti spektrofotometrijski (Castegna i sur., 2003).

### 1.2.3. Oštećenje DNA

Promjene na molekuli DNA izazvane oksidacijskim stresom nastaju oksidacijskim modifikacijama nukleotidnih baza i šećera ili pak stvaranjem unakrsnih veza. Rezultati takvih promjena su oksidacija baza i fragmentacija nastalih produkata, jednolančani odnosno dvolančani lomovi te stvaranje unakrsnih veza unutar i izvan lanca DNA (Balasubramanyam i sur., 2010).

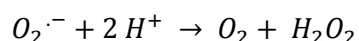
Za utvrđivanje oštećenja molekule DNA koristi se test naziva gel elektroforeza jedne stanice (*Single Cell Gel Electrophoresis assay*, SCGE) ili kraće Comet test. Comet testom mjerimo lomove na lancu molekule DNA. Elektroforeza se izvodi uz visoku vrijednost pH pufera za elektroforezu, nakon čega fluorescencijskim mikroskopom uočavaju strukture koje su nalik na komete, a njihova razlika u fluorescencijskom intenzitetu između „repa“ i „glave“ govori o broju lomova molekule DNA.

### 1.2.4. Antioksidacijski enzimi

#### 1.2.4.1. Superoksid dismutaza

Enzim superoksid dismutaza (SOD) djeluje na superoksidni radikal. To je prvi oblik reaktivnih oblika kisika koji se formira kao produkt jednovalentne redukcije kisika u biološkim sustavima. Superoksid dismutaza se „bori“ protiv kisikovih radikala te tako tvori prvobitnu obranu. Kako ne bi došlo do Haber-Weissvog tipa reakcije katalizirane metalom i nastanka hidroksilnog radikala, superoksidni radikal se uklanja (Arora i sur., 2002). Prema metalu koji se nalazi u aktivnom mjestu enzima, superoksid dismutaze se dijele na četiri skupine: mangan (Mn-SOD), nikal (Ni-SOD), bakar i cink (Cu/Zn-SOD) te željezo (Fe-SOD) (Ahmad i sur., 2010).

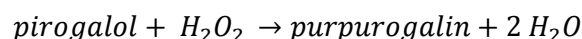
SOD katalizira reakciju disproporcioniranja  $O_2^{\cdot-}$  na  $O_2$  i  $H_2O_2$  na sljedeći način:



#### 1.2.4.2. Peroksidaze

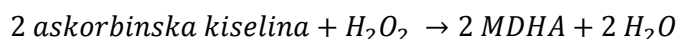
U biljnom i životinjskom svijetu peroksidaze su široko rasprostranjene. To su enzimi koji kao prostetičku skupinu imaju hem, koji se preko dva histidina veže s glikoproteinskim dijelom enzima. One pripadaju porodici enzima oksidoreduktaze koje općenito kataliziraju razgradnju vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ), pri čemu nastaje molekula  $H_2O$  (Hiraga i sur., 2001).

Pirogalol peroksidaza (PPX) katalizira pretvorbu  $H_2O_2$  u  $H_2O$ , a pirogalol mu služi kao supstrat koji donira elektrone za razgradnju  $H_2O_2$  što se može prikazati reakcijom:



PPX nalazimo u mnogim odjeljcima biljnih stanica kao što su: vakuola, Golgijevo tijelo, mitohondrij i dr., pa možemo reći da postoje mnoge izoforme koje imaju različit neto naboj i masu. Mogu se razdvojiti elektroforezom u nativnim uvjetima (Hiraga i sur., 2001; Milošić, 2014).

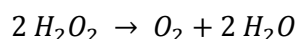
Askorbat peroksidaza (APX) također pripada skupini peroksidaza, a glavna uloga joj je uklanjanje  $H_2O_2$  korištenjem askorbata kao supstrata. Uklanja  $H_2O_2$  u dijelu ciklusa pod imenom askorbat–glutation ciklus, odnosno katalizira pretvorbu  $H_2O_2$  u  $H_2O$ . Elektrone za pretvorbu u ciklusu donira askorbat (specifični donor elektrona) koji se pritom oksidira do monodehidroaskorbinske kiseline (MDHA). To možemo prikazati reakcijom:



APX ima pet izoformi, a sve ih karakterizira visoka specifičnost za askorbat kao donora elektrona (Caverzan i sur., 2012). Aktivnost askorbat peroksidaze se gubi ako je koncentracija askorbata u stanici uspod  $20 \mu M$  (Shigeoka i sur., 2002).

#### 1.2.4.3. Katalaza

Katalaza (CAT) je tetramerni enzim u kojem svaki dio sadrži jednu molekulu hema. Katalaze pretvaraju  $H_2O_2$  u  $H_2O$  i molekularni kisik ( $O_2$ ). Svi aerobni organizmi imaju enzim katalazu, a nalazi se u peroksisomima gdje uklanja  $H_2O_2$  nastao uslijed fotorespiracije i oksidacije masnih kiselina. Pretvorbu  $H_2O_2$  u  $H_2O$  i  $O_2$  možemo prikazati reakcijom:



Dva su načina na koja katalaza može ukloniti  $H_2O_2$ , direktnom dismutacijom i/ili oksidacijom alkohola, formaldehida ili nitrita vodikovim peroksidom (Ahmed i sur., 2010). Katalaza ima slabu supstratnu specifičnost jer su joj istovremeno potrebne dvije molekule  $H_2O_2$  vezane na aktivno mjesto, ali zato ima visoku katalitičku aktivnost.

### 1.3. Duhan (*Nicotiana tabacum* L.) kao modelni organizam

U svom diplomskom radu istraživanja sam provodila na odraslim biljkama duhana (*Nicotiana tabacum* L.), koji dolazi iz porodice pomoćnica (Solanaceae). Duhan je jednogodišnja, zeljasta biljka koja može narasti od 0,5 m do 3 metra. Zeleni listovi postavljeni su naizmjenično i prekriveni su žljezdastim dlačicama, a mogu narasti od 0,6 m do 1 m ovisno o tome koliko je vode, sunca i nutrijenata dostupno biljci. Na jednoj stabljici može biti i do 100 listova. Cvjetovi duhana se nalaze u terminalnim nakupinama, dvospolni su te im boja može varirati od bijele preko ružičaste do crvene. Duhan je biljka koja brzo raste i dobro se prilagođava klimi i tlu. Cvijeta od srpnja do rujna, kada se obavljaju berbe listova u etapama. Plod je tobolac, u kojem se nalazi veliki broj jajolikih do bubrežastih sjemenki.

Duhan originalno potječe iz Južne Amerike, ali zbog svoje prilagodbe različitim klimama i tlima danas je rasprostranjen diljem svijeta. Uzgaja se zbog svojih listova, koji se osušeni prerađuju za pušenje i žvakanje. Naime, biljka u svom korijenu proizvodi nikotin kojeg zatim odlaže u listove. Nikotin je alkaloid zbog kojeg je duhan postao ekonomski važna vrsta u cijelom svijetu jer se koristi za izradu cigareta i drugih proizvoda u duhanskoj industriji. Danas je dokazano da se konzumacijom duhana stvara ovisnost i da je povezana sa mnogim drugim bolestima u ljudi kao što su: rak, plućne bolesti, bolesti krvnih žila i srca (Benowitz, 2010).

Biljka duhana koristi se u znanosti kao modelni organizam u istraživanjima u molekularnoj biologiji, staničnoj biologiji, kulturi tkiva i genetičkom inženjerstvu (Brar i sur., 1994; Flick i sur., 1984). Dobar je modelni organizam jer ima kratko regeneracijsko vrijeme i lagano se transformira. Tijekom rada s duhanom, Murashige i Skoog (1962) razvili su sustav hranjivih podloga za uzgoj biljaka u uvjetima *in vitro*, što je kasnije primijenjeno za uzgoj različitih biljnih vrsta u kulturi biljnog tkiva i stanica (Ganapathi i sur., 2004.)



**CILJ ISTRAŽIVANJA**

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Nanotehnologija u današnje vrijeme se brzo razvija pa se tako raširila upotreba različitih vrsta nanomaterijala. Povećana upotreba nanočestica nametnula je pitanje kakav utjecaj nanočestice imaju na okoliš i organizme. Ovo istraživanje je usmjereno na ispitivanje nastanka oksidacijskog stresa u biljkama duhana (*Nicotiana tabacum* L.) izloženim nanočesticama srebra, a cilj istraživanja je:

1. Utvrditi izazivaju li odabrane koncentracije nanočestica srebra (i) pojavu oksidacijskog stresa, (ii) oštećenje biološki važnih molekula i (iii) promjene u aktivnosti i ekspresiji antioksidacijskih enzima u odraslim biljkama duhana (*Nicotiana tabacum* L.).
2. Usporediti utjecaj ispitivanih koncentracija nanočestica srebra na pojavu oksidacijskog stresa u korijenu i listu biljke duhana.
3. Usporediti utjecaj ispitivanih koncentracija nanočestica srebra s utjecajem istih koncentracija ionskog srebra za sve prethodno navedene parametre.

## **MATERIJALI I METODE**

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. Metode**

##### **3.1.1. Nanočestice srebra (AgNP)**

Nanočestice srebra (AgNP) pripravljene su redukcijskim postupkom iz srebrovog nitrata ( $\text{AgNO}_3$ ) i stabilizirane pomoću negativno nabijenog citratnog aniona. Na taj način dobivene su negativno nabijene nanočestice AgNP-citrat. AgNP je pripremila dr. sc. Ivana Vinković Vrček na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.

##### **3.1.2. Biljni materijal**

Istraživanje za svoj diplomski rad provela sam na odraslim biljkama duhana (*Nicotiana tabacum* L.). Kako bih mogla provesti istraživanje na odraslim biljkama, prvo sam nasadila sjemenke duhana. Sjemenke sam sterilizirala inkubacijom u 50%-tnoj (v/v) otopini NaOCl na mješalici u trajanju od 15 minuta. Nakon inkubacije isprala sam ih nekoliko puta destiliranom vodom te mikropipetom nasadila na svježu hranidbenu podlogu MS (Murashige i Skoog, 1962). Na navedenoj podlozi sjemenke su isključile u biljčice, koje su rasle 60 dana dok nisu u potpunosti razvile korijenov sustav, nakon čega su prebačene u svježe pripremljene tekuće podloge MS koje su sadržavale izabrane koncentracije AgNP i  $\text{AgNO}_3$  (25, 50, 75, 100 i 500  $\mu\text{M}$ ). Kontrolne biljke rasle su na tekućoj podlozi MS bez dodatka AgNP ili  $\text{AgNO}_3$ . Nakon 7 dana tretmana uzorkovala sam tkivo korijena i lista odraslih biljaka za daljnje analize.

#### **3.2. Metode**

##### **3.2.1. Ekstrakcija ukupnih topivih proteina**

Odrasle biljke duhana pincetom sam izvadila iz tekućih hranidbenih podloga, korijenje isprala destiliranom vodom te korijene i listove posebno osušila na papirnatom ručniku. Nakon toga sam vagala 0,4 g tkiva korijena i lista, po 6 replika od svake koncentracije AgNP i  $\text{AgNO}_3$ . U ohlađeni tarionik, koji se nalazio na ledu, stavila sam izvagano tkivo. Na vrhu spatule dodala sam malo polivinilpirolidona (PVP, oko 10 mg) te 1 mL hladnog 0,1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 i homogenirala tkivo uz pomoć tučka. Homogenate sam centrifugirala prvo 15 minuta na 14000 rpm pri 4 °C, nakon čega sam supernatante prebacila u čiste tubice te ponovno centrifugirala 60 minuta na 14000 rpm 4 °C. Supernatante sam ponovno prebacila u čiste tubice te pohranila na -20 °C kako bi ih očuvala za daljnje analize.

### 3.2.2. Određivanje koncentracije proteina

Koncentraciju proteina odredila sam metodom po Bradfordu (1976), a metoda se temelji na vezanju boje *Comassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 na proteine. Prvo sam pripremila Bradford matičnu otopinu (0,01% CBB G-250; 31,35% (v/v) etanol; 58,6% (v/v)  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), koja mi je bila potrebna za pripremu Bradford radne otopine (2,58% (v/v) etanol; 5,28% (v/v)  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ; 6% (v/v) Bradford matična otopina), koja se koristi za mjerenje koncentracije proteina. Izradila sam baždarni pravac pomoću otopina goveđeg serumskog albumina (engl. *bovine serum albumin*, BSA) poznatih koncentracija (0,2 – 2,0 mg mL<sup>-1</sup>) koje su bile pripremljene u 0,1 M kalij-fosfatnom puferu pH 7,0. U tubicu sam dodala 980  $\mu\text{L}$  Bradford radne otopine i 20  $\mu\text{L}$  proteinskog uzorka, nakon čega sam tubicu promiješala na vorteksu i sadržaj prebacila u kivetu. Intenzitet nastalog plavog obojenja pri reakciji proteina s Bradfordovom otopinom mjerila sam spektrofotometrom *ATI/Unicam UV4-110* (Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo) na valnoj duljini od 595 nm. Očitavanjem prethodno napravljenje baždarne krivulje u svakom proteinskom uzorku sam odredila koncentraciju proteina izraženu u mg mL<sup>-1</sup>.

### 3.2.3. Dihidroetidij test

U stanici je moguće mjeriti razinu oksidacijskog stresa detekcijom reaktivnih oblika kisika (ROS), a u svom diplomskom radu ja sam koristila dihidroetidij (DHE) test (Domijan i Abramov, 2011; Cvjetko i sur., 2017) i fluorescencijsku mikroskopiju. Odabrala sam korijen i list od svake ispitivane koncentracije AgNP i  $\text{AgNO}_3$ , te ih inkubirala s 10  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{M}$  otopine DHE, u plastičnim tubicama, 25 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim sam uzorke prenijela na predmetno stakalce te analizirala fluorescentnim mikroskopom (*Olympus BX-51*, Tokio, Japan) koji je bio povezan s kamerom (*Olympus DP70*, Tokio, Japan), nakon čega sam snimila fotografije. Uz pomoć računalnog programa *Lucida 6.0* provela sam analizu intenziteta fluorescencije na 100 nasumično odabranih stanica po stakalcu. Rezultati koji su dobiveni su prikazani prema relativnom intenzitetu u odnosu na kontrolni uzorak.

### 3.2.4 Ekstrakcija lipida i određivanje sadržaja malondialdehida

Ekstrakciju lipida sam provela u ohlađenom tarioniku homogeniranjem 0,4 g tkiva korijena i lista u 1300  $\mu\text{L}$  (2 x 650  $\mu\text{L}$ ) ekstrakcijskog pufera (0,3% (w/v) tiobarbituratna kiselina (TBA) u 10% (w/v) trikloroetenoj kiselini (TCA)). Ekstrakte sam prelija u tubice za daljnju analizu i koristila za određivanje sadržaja malondialdehida.

Razinu lipidne peroksidacije odredila sam mjerenjem sadržaja malondialdehida (MDA) koji je najučestaliji produkt nastao tijekom oštećenja lipida u stanici, a za to sam koristila metodu prema Heathu i Packeru (1968). Dobivene ekstrakte sam 30 minuta zagrijavala na termomikseru na 95 °C. Tijekom zagrijavanja tubice moraju biti otvorene jer smjesa vrije, a zatim se ohlade u posudi s ledom i centrifugiraju 15 minuta na 8000 rpm i 4 °C. Dobivene supernatante sam prelila u kivete i spektrofotometrijski izmjerila apsorbanciju na 532 nm i 600 nm; od očitane vrijednosti na 532 nm oduzela sam vrijednost koja je očitana na 600 nm, jer se asorbancija na 600 nm mjeri zbog korekcije za nespecifično zamućenje. Za slijepe probe koristila sam 200 µL kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 i 1300 µL navedenog ekstrakcijskog pufera. Prema koncentraciji MDA u nmol g<sup>-1</sup> svježe tvari može se izraziti razina lipidne peroksidacije, a jednadžba glasi:

$$\text{sadržaj MDA} = \frac{A_{532} - A_{600}}{m \times \varepsilon \times l} [\text{nmol g}^{-1} \text{svježe tvari}]$$

gdje je:

A<sub>532</sub> – apsorbancija izmjerena na 532 nm

A<sub>600</sub> – apsorbancija izmjerena na 600 nm

m – masa tkiva

l – duljina puta (1 cm)

ε - molarni apsorpcijski koeficijent (155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

### 3.2.5. Određivanje sadržaja proteinskih karbonila

Sadržaj proteinskih karbonila odredila sam metodom prema Levinu i sur. (1994), koja se temelji na reakciji karbonilnih skupina s dinitrofenilhidrazinom (DNPH). Za mjerenje su mi bila potrebna dva seta plastičnih tubica; u jedan set sam stavila 200 µL proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.2.1) i 300 µL 10 mM otopine DNPH u 2 M HCl, a drugi set je bio kontrolni i u njega sam također stavila 200 µL proteinskog ekstrakta i 300 µL 2 M HCl. Oba seta lagano sam promiješala na vorteksu i inkubirala 1 h u mraku na sobnoj temperaturi, uz povremeno potresanje. Zatim sam u sve uzorke dodala 500 µL 10%-tne TCA za precipitaciju proteina i ostavila ih 5 minuta na –20 °C. Uzorke sam nakon toga centrifugirala 10 minuta na 14000 rpm na 4 °C, odlila supernatant, te nastali talog ispirala 3 puta sa po 500 µL otopine etanol/etilacetat (u omjeru 1:1), kako bi se uklonio nevezani reagens. Na kraju sam, vorteksiranjem, otopila talog u 1 mL 6 M uree, koja je bila otopljena u 20 mM kalij-fosfatnom puferu pH 2,4. Spektrofotometrijsko mjerenje izvodila sam pri 370 nm, s tim da je svaki uzorak koji sadrži DNPH imao je svoju slijepu probu bez DNPH. Sadržaj karbonila izračunala sam prema jednadžbi:

$$\text{sadržaj karbonila} = \frac{A_{370}}{m \times \epsilon \times l} [\mu\text{mol mg}_{\text{proteina}}^{-1}]$$

gdje je:

$A_{370}$  – apsorbancija izmjerena na 370 nm

$m$  – koncentracija proteina ( $\text{mg}_{\text{proteina}} \text{mL}^{-1}$ )

$\epsilon$  - molarni apsorpcijski koeficijent ( $22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$l$  – duljina optičkog puta (1 cm)

### 3.2.6. Comet test

Primjenom Comet testa (Gichner i sur., 2004) pronašla sam i izmjerila oštećenja molekule DNA. Mehanički sam izolirala jezgre stanica radeći rezove žiletom po listovima i korijenju duhana uronjenima u 250  $\mu\text{L}$  400 mM 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol-HCl (Tris-HCl) pH 7,5 pri 4 °C i pomiješane s 250  $\mu\text{L}$  agaroze niskog tališta (LMP, 1% (w/v) u puferiranoj otopini fosfatnih soli (PBS, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,7 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 130 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4) prethodno zagrijanoj na 42 °C. Na predmetna stakalca, na kojima se nalazila 1%-tna (w/v) otopina agaroze normalnog tališta (NMP) u destiliranoj vodi, nanijela sam pripremljenu smjesu. Predmetna stakalca pokrila sam pokrovnicom te stavila na led kako bi se agarosa stvrdnula. Posudu za horizontalnu elektroforezu ispunila sam hladnim puferom za elektroforezu (1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  i 300 mM NaOH, pH > 13) i prije prijenosa predmetnih stakalaca u posudu, uklonila sam s njih pokrovna stakalca. U posudi s puferom stakalca su stajala 10 minuta kako bi došlo do denaturacije DNA, zatim je elektroforeza pokrenuta pri 0,8 V  $\text{cm}^{-1}$  i 300 mA u trajanju od 20 minuta. Nakon toga stakalca sam ispirala tri puta po 5 minuta neutralizacijskim puferom (400 mM Tris-HCl, pH 7,5) i na kraju uronila u destiliranu vodu. Stakalca su zatim inkubirana u 70  $\mu\text{L}$  etidijevog bromida (20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) u periodu od 5 minuta. Sa svakog stakalca sam izabrala 150 jezgara za analizu fluorescencijskim mikroskopom (*Olympus BX-51*, Tokio, Japan) s ekscitacijskim filterom BP 520/09 nm i graničnim filterom od 610 nm. Računalnim programom *Komet ver. 5* izmjeren je postotak DNA u repu (%DNA), što je primarna mjera oštećenja molekule DNA.

### 3.2.7. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima

#### 3.2.7.1. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) mjerila sam metodom prema Beauchampu i Fridovichu (1971). U 800  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese, koja se sastojala od 13 mM metionina, 75  $\mu\text{M}$  nitroblue tetrazoliuma (NBT) i 0,1 M etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA), dodala sam 190  $\mu\text{L}$  kalij-fosfatnog pufera pH 7,8 i 10  $\mu\text{L}$  otopine 2 mM riboflavina. Nakon što sam dodala

riboflavin, izmješala sam kivete sa reakcijskom smjesom i izložila djelovanju svjetlosti transiluminatora (15 W) u trajanju od 8 minuta. U prisutnosti superoksidnih radikala NBT se reducira u netopivi plavo obojeni formazan koji ima apsorpcijski maksimum na valnoj duljini od 560 nm. Navedena smjesa koja nije bila izložena svjetlosti korištena je kao slijepa proba. Za daljnju analizu, smanjila sam količinu kalij-fosfatnog pufera u reakcijskoj smjesi i dodala istu količinu uzorka kontrole (poglavlje 3.2.1), kako bi dobila smanjenje apsorbancije od 50%. Nakon toga uslijedio je identičan postupak sa svim proteinskim uzorcima i sa SOD standardima. SOD standardi su razrijeđenja otopina poznatih koncentracija koja se kreću u rasponu od 0,025 do 1 U  $\mu\text{L}^{-1}$ . Dobiveni rezultati su linearizirani tako da su vrijednosti aktivnosti maksimuma, odnosno neinhibirane kontrole podijeljeni s rezultatima koji su dobiveni za uzorke (SOD standarde). SOD standardi su mi pomogli u izradi baždarne krivulje te sam na temelju baždarne krivulje izračunala aktivnost SOD za svaki uzorak. Aktivnost SOD-a izražena je kao  $\mu\text{mol}_{\text{produkta}} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{proteina}}$  odnosno U  $\text{mg}^{-1}_{\text{proteina}}$ .

### 3.2.7.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti pirogalol peroksidaze (PPX)

Metodom prema Nakanu i Asadu (1981) određivala sam aktivnost pirogalol peroksidaze (PPX). Za određivanje aktivnosti PPX pripremila sam reakcijsku smjesu, koja se sastojala od 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera u kojem je otopljeno 0,126 g pirogalola i prije korištenja dodano 5,5  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Reakcijsku smjesu potrebno je staviti u tamnu bocu ili zamotati u aluminijsku foliju. Za slijepu probu koristila sam 980  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese u koju sam dodala 20  $\mu\text{L}$  0,1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7,0. Za mjerenje aktivnosti PPX u uzorcima, u 980  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese dodala sam 20  $\mu\text{L}$  proteinskih ekstrakta (poglavlje 3.2.1). Mjerenje aktivnosti sam provodila svakih 15 sekundi tijekom 1 minute na valnoj duljini od 430 nm. Aktivnost PPX izrazila sam jednadžbom:

$$PPX = \frac{\Delta A_{s.v.} \times 4 \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uz} \times \epsilon \times L} [\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}]$$

$$PPX = \frac{\Delta A_{\mu\text{mol/min mL}}}{\text{mg(proteina)/mL}} [\mu\text{mol}_{\text{produkta}} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{proteina}}]$$

gdje je:

$\Delta A_{s.v.}$  – srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 430 nm u 15 s

4 – faktor korekcije za  $\Delta A_{s.v.}$  za izražavanje rezultata u minuti

$V_{r.s.}$  – volumen reakcijske smjese (1 mL)

F.R. – faktor razrjeđenja uzorka (1)

$V_{uz}$  – volumen uzorka (50  $\mu\text{L}$ )

$\epsilon$  – molarni apsorpcijski koeficijent (2,47  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )

$l$  – duljina optičkog puta (1 cm)



### 3.2.7.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze (APX)

Aktivnost askorbat peroksidaze mjerila sam metodom prema Nakano i Asada (1981). Za mjerenje sam pripremila otopine 10 mM EDTA, 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,0, 12 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 mM askorbinske kiseline i pufer A sastavljen od 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 i 500 µL 10 mM EDTA. Slijepa proba se sastojala od 800 µL pufera A, 180 µL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera, 10 µL 10 mM askorbinske kiseline i 10 µL 12 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Reakcijska smjesa za mjerenje aktivnosti APX sastojala se od 800 µL pufera A, 10 µL mM askorbinske kiseline i 10 µL 12 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u koju sam dodala 180 µL proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.2.1). Zbog oksidacije askorbinske kiselina aktivnost sam odredila mjereći pad apsorbancije na valnoj duljini od 290 nm svake sekunde tijekom 15 sekundi. Aktivnost APX izračunala sam prema jednadžbi:

$$APX = \frac{\Delta A_{s.v.} \times 4 \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uz} \times \varepsilon \times L} [\mu mol \min^{-1} mL^{-1}]$$

$$APX = \frac{\Delta A_{\mu mol / \min mL}}{mg(proteina) / mL} [\mu mol_{produkta} \min^{-1} mg_{proteina}^{-1}]$$

gdje je:

$\Delta A_{s.v.}$  – srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 290 nm u 15 s

4 – faktor korekcije za  $\Delta A_{s.v.}$  za izražavanje rezultata u minuti

$V_{r.s.}$  – volumen reakcijske smjese (1 mL)

F.R. –faktor razrjeđenja uzorka (1)

$V_{uz}$  – volumen uzorka (0,18 mL)

$\varepsilon$  - molarni apsorpcijski koeficijent (2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

$l$  – duljina optičkog puta (1 cm)

### 3.2.7.4 Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Za određivanje aktivnosti katalaze koristila sam metodu prema Aebi (1984). Reakcijsku smjesu pripremila sam mješanjem 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 sa 51 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Za slijepu probu koristila sam smjesu 950 µL reakcijske otopine i 50 µL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7,0, a za mjerenje sam pomiješala 950 µL reakcijske smjese i 50 µL ekstrakta (poglavlje 3.2.1). Zbog utroška H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apsorbancija se smanjivala, a promjene u apsorbanciji mjerila sam svakih 10 sekundi tijekom dvije minute na valnoj duljini od 240 nm. Aktivnost katalaze izračunala sam prema jednadžbama:

$$CAT = \frac{\Delta A_{s.v.} \times 6 \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uz} \times \varepsilon \times L} [\mu mol \min^{-1} mL^{-1}]$$

$$CAT = \frac{\Delta A_{\mu mol/min mL}}{mg(proteina)/mL} [\mu mol H_2O_2 min^{-1} mg_{proteina}^{-1}]$$

gdje je:

$\Delta A_{s.v.}$  – srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 240 nm u 10 s

6 – faktor korekcije za  $\Delta A_{s.v.}$  za izražavanje rezultata u minuti

$V_{r.s.}$  – volumen reakcijske smjese (1 mL)

F.R. –faktor razrjeđenja uzorka (1)

$V_{uz}$  – volumen uzorka (0,05 mL)

$\epsilon$  - molarni apsorpcijski koeficijent ( $40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$l$  – duljina optičkog puta (1 cm)

### 3.2.8. Razdvajanje proteina nativnom poliakrilamid gel elektroforezom

U stanicama je moguće naći veliki broj izoformi nekog enzima, a može ih se razdvojiti nativnom elektroforezom. Elektroforetska pokretljivost enzima ovisi o molekulskoj masi, izoelektričnoj točki i gustoći naboja molekule (Balen i sur., 2011b).

Otopine za gelove za nativnu elektroforezu pripremila sam prema Tablici 1. i izlila ih u sendvič sastavljen od staklenih ploča. Staklene ploče prije izljevanja gela moraju biti očišćene 96%-tnim etanolom, a nakon izljevanja gelovi se ostave da se polimeriziraju barem jedan sat. Između staklenih ploča prvo sam ulila gel za razdvajanje, a kako bih spriječila kontakt gela sa zrakom, nadsvodila sam ga s 20%-tnim etanolom. Nakon što se gel polimerizirao odlila sam dodani etanol, a prostor između ploča isprala redestiliranom vodom. Zatim sam pripremila gel za sabijanje, ulila ga između staklenih ploča, stavila češljeve i ostavila da se polimerizira jedan sat. Nakon završetka polimerizacije, izvadila sam češljeve. U formirane jažice iglom Hamilton (Reno, Nevada, SAD) nanijela sam proteinske ekstrakte (poglavlje 3.2.1) koje sam prije nanošenja pomiješala s 10  $\mu\text{L}$  0,5 %-tne otopine saharoze i boje bromfenol plavo (BFB). Saharoza povećava gustoću uzoraka i osigurava da „sjednu“ na dno jažice, a boja BFB olakšava praćenje tijekom elektroforeze. U jažice sam nanosila 100  $\mu\text{g}$  proteina. Ploče s gelovima prenijela sam na elektrodni nosač koji sam postavila u kadicu u koju sam ulila elektrodni pufer sastava: 0,25 M Tris i 1,92 M glicin. Elektroforezu sam provodila u kadici *PROTEAN® II xi Cell* (Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD) na 4 °C; prvih 45 minuta pri 100 V kako bi u gel za razdvajanje ušli uzorci, a zatim sam napon povišala na 220 V do kraja elektroforeze. Nakon završetka elektroforeze gelove sam tretirala prema različitim protokolima, ovisno o enzimu koji se istražuje.

**Tablica 1.** Sastav gelova za elektroforezu u nativnim uvjetima

otopine	gel za razdvajanje (10%)	gel za sabijanje (4%)
reH <sub>2</sub> O	16,8 mL	6,1 mL
Tris-HCl	1,5 M; pH 8,8; 10 mL	0,5 M; pH 6,8; 2,5 mL
akrilamid/bisakrilamid (AA/Bis)	13,2 mL	1,3 mL
10% amonijev persulfat (APS)	200 µL	50 µL
tetrametiletilendiamin (TEMED)	20 µL	10 µL

### **3.2.8.1. Određivanje aktivnosti i broja izoformi antioksidacijskih enzima u gelu**

#### **3.2.8.1.1. Određivanje aktivnosti i broja izoformi superoksid dismutaze (SOD)**

Za određivanje aktivnosti i broja izoformi SOD-a, gel sam inkubirala 25 minuta u 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,8 u kojemu sam otopila 100 mg NBT-a. Zatim sam pripremila 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,8 u koji sam dodala 100 µL 2mM riboflavina i 425 µL TEMED-a i inkubirala gel 15 minuta u tami. Nakon toga sam ga izložila djelovanju svjetlosti transiluminatora sve dok se nisu pojavile akromatske vrpce na plavičastoj podlozi (Beauchamp i Fridovich, 1971). Gel sam zatim izvadila iz otopine i skenirala.

#### **3.2.8.1.2. Određivanje aktivnosti i broj izoformi pirogalol peroksidaze (PPX)**

Za detekciju aktivnosti i izoformi PPX nakon native elektroforeze koristila sam metodu prema Chance i Maehly-u (1955). Gel sam inkubirala 30 minuta u 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,0, nakon čega je slijedila inkubacija od 20 minuta u 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera u koji sam dodala 0,252 g pirogalola i 40 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nakon 5-10 minuta pojavile su se žuto-smeđe vrpce izoenzima peroksidaze te sam gel odmah skenirala jer se stajanjem gubi obojenje.

#### **3.2.8.1.3. Određivanje aktivnosti i broja izoformi askorbat peroksidaze (APX)**

Za detekciju aktivnosti i izoenzima APX u 5 L elektrodnog pufera za elektroforezu u nativnim uvjetima (poglavlje 3.2.8.) otopila sam 1,761 g askorbinske kiseline. Po završetku elektroforeze gel sam inkubirala 3 puta po 10 minuta u 50 mM kalij-fosfatnom puferu pH 7,0 u kojem sam otopila 0,212 g askorbinske kiseline. Nakon 30 minuta inkubacije u ovoj otopini slijedila je inkubacija od 20 minuta u 50 mM kalij-fosfatnom puferu pH 7,0 u koji sam dodala

0,14 g askorbinske kiseline i 41  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Nakon toga sam gel isprala jednu minutu u 50 mM kalij-fosfatnom puferu pH 7,0 te zatim inkubirala u 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,8 s dodatkom 860  $\mu\text{L}$  TEMED-a i 0,3 g NBT-a (Mittler i Zilinkas, 1993). U ovoj otopini se gel inkubirao 10–15 minuta, nakon čega su se pojavile akromatske vrpce na plavoljubičastoj podlozi.

#### **3.2.8.1.4. Određivanje aktivnosti i broja izoformi katalaze (CAT)**

Prema protokolu Woodbury i sur. (1971) provodila sam detekciju aktivnosti i izoformi katalaze (CAT) u gelu. Nakon elektroforeze, gel sam ispirala 3 puta po 15 minuta u destiliranoj vodi. Nakon 45 minuta ispiranja slijedila je 15 minutna inkubacija u 100 mL destilirane vode u koju sam dodala 51  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dok se gel inkubirao pripremila sam dvije otopine koje su mi bile potrebne za daljnju obradu gela. Prvu otopinu pripremila sam otapanjem 0,5 g  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  u 50 mL destilirane vode, a drugu otapanjem 0,5 g  $\text{FeCl}_3$  u 50 mL destilirane vode. Nakon kratkog ispiranja u destiliranoj vodi, gel sam inkubirala u mješavini prethodno navedenih otopina do pojave žuto obojenih vrpce na zelenoj podlozi.

#### **3.2.9. Analiza ekspresije ukupnih proteina razdvajanjem natrijev dodecil sulfat-poliakrilamid gel elektroforezom (SDS-PAGE)**

Natrijev dodecil sulfat-poliakrilamid gel elektroforezu (SDS-PAGE) koristila sam za analizu ekspresije ukupnih proteina. SDS-PAGE se temelji na razaranju disulfidnih veza u proteinu uz pomoć natrijevog dodecil sulfata (SDS), čime se postiže disocijacija proteina u pojedinačne polipeptidne lance. Budući da SDS maskira prirodni naboj proteina i svi proteini pomiješani s SDS-om postaju negativno nabijeni, oni se tijekom elektroforeze razdvajaju isključivo temeljem njihovog efektivnog promjera, odnosno njihove molekulske mase (Balen i sur., 2011b).

##### **3.2.9.1. SDS-PAGE elektroforeza**

Laemmli (1970) je opisao SDS-PAGE elektroforezu, pa sam je i ja izvela prema toj metodi. Prvo sam pripremila otopine za gelove prema uputama iz Tablice 1. (poglavlje 3.2.8.) uz dodatak 10%-tne otopine SDS-a. U gel za razdvajanje dodala sam 100  $\mu\text{L}$ , a u gel za sabijanje 50  $\mu\text{L}$  10%-tne otopine SDS-a, a gelove sam izlila u sendviče koje sam sastavila od staklenih ploča. Nakon što su se gelovi polimerizirali, u jažice sam nanosila prethodno pripremljene i denaturirane uzorke. Uzorke sam pripremila miješanjem određenog volumena proteinskih ekstrakata i pufera za denaturaciju uzoraka (187,5 mM Tris-HCl, 20% glicerol,

6% SDS, 5%  $\beta$ -merkaptotanol, 0,1% BFB). Denaturaciju sam provodila 5 minuta pri temperaturi od 95 °C, u termomikseru uz kontinuirano miješanje. U jažice gelova koje sam bojala bojom *Comassie Brilliant Blue* (CBB) R-250 nanosila sam 12  $\mu$ g proteina, dok sam za gelove bojane srebrovim nitratom nanosila 6  $\mu$ g proteina po jažici. Nakon nanošenja proteinskih uzoraka, staklene ploče pričvrstila sam na elektrodni nosač i postavila u kadicu. U kadicu sam ulila elektrodni pufer sastava 0,25 M Tris, 1,92 M glicin i 10% (w/v) SDS. Elektroforezu sam provodila u kadici *PROTEAN® II xi Cell* (Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD) pri 100 V prvih 45 minuta kako bi uzorci ušli u gel za razdvajanje, a nakon toga sam napon povećala na 220 V do kraja elektroforeze. Kontinuirani pristup hladne vode održavao je temperaturu stalnom.

### 3.2.9.2. Bojanje gelova bojom *Comassie Brilliant Blue* i srebrovim nitratom

Bojanje gelova bojom CBB opisano je u Balen i sur. (2011b), pa sam i ja izvodila opisani način bojenja gelova. Nakon završetka elektroforeze, gelove sam inkubirala dva sata u otopini za bojanje (0,1% (w/v) CBB R-250, 45% (v/v) metanol, 10% (v/v) ledena octena kiselina) na tresilici i sobnoj temperaturi. Nakon toga slijedilo je odbojavanje u otopini sastava 10% (v/v) octena kiselina i 20% (v/v) metanol na tresilici i sobnoj temperaturi. Otopinu za odbojavanje mijenjala sam nekoliko puta sve dok se pozadina gela nije potpuno obezbojila, a na gelu se pojavile plave vrpce proteina, nakon čega sam gelove skenirala.

Bojanje gela srebrovim nitratom izvodila sam prema metodi koju su razvili Blum i sur. (1987). Nakon završetka elektroforeze gelove sam inkubirala jedan sat u otopini za fiksiranje (50% etanol, 12% octena kiselina, 500  $\mu$ L formaldehida i destilirana voda do 1 L), nakon čega sam ih ispirala 3 puta po 20 minuta u otopini 30%-tnog etanola. Nakon ispiranja gelove sam inkubirala u otopini  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  jednu minutu, nakon čega je slijedilo ispiranje redestiliranom vodom 3 puta po 20 sekundi. U otopini za razvijanje (6 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 50  $\mu$ L formaldehida, 2 mL otopine  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  i redestilirane vode do 100 mL) gel sam inkubirala do pojave smeđe obojenih proteinskih vrpca. Razvijanje sam prekinula upotrebom otopine sastava 50% etanol, 12% octena kiselina i destilirana voda, nakon čega sam gelove skenirala.

### 3.2.10. Imunodetekcija proteina na membrani

Imunodetekciji proteina prethodile su SDS-PAG elektroforeze na malim pločama. Prije same SDS-PAG elektroforeze pripremila sam otopine za gelove čiji je sastav prikazan u Tablici 2. Od staklenih ploča složila sam sendviče, te sam u njih prvo ulila gel za razdvajanje pa gel za sabijanje. Nakon polimerizacije izvadila sam češljeve, a u jažice nanosila

proteinske uzorke (10 µg proteina), koje sam pomiješala s puferom za denaturaciju i denaturirala (poglavlje 3.2.9.1). Ploče sam postavila na elektrodne nosače i ulila elektrodni pufer (0,25 M Tris, 1,92 M glicin i 10% (w/v) SDS). Elektroforezu sam provodila u kadici *Mini PROTEAN® Tetra Cell* (Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD) prvih 15 minuta pri 100 V, a nakon toga povećala sam napon na 200 V do kraja elektroforeze.

**Tablica 2.** Sastav gela za malu SDS-PAGE elektroforezu

otopine	gel za razdvajanje (12%)	gel za sabijanje (4%)
reH <sub>2</sub> O	3,5 mL	3,05 mL
Tris-HCl	1,5 M;pH 8,8; 2,5 mL	1,25 mL
AA/Bis	4 mL	0,665 mL
10% SDS	100 µL	50 µL
10% APS	50 µL	35 µL
TEMED	5 µL	8 µL

### 3.2.10.1. Prijenos proteina na membranu i određivanje ekspresije antioksidacijskih enzima imunodetekcijom

Nakon završetka SDS-PAGE elektroforeze pokrenula sam prijenos proteina na membranu prema protokolu opisanom u Balen i sur. (2011b). Pufer za prijenos (28 mM Tris, 192 mM glicin, 10% (v/v) metanol) ulila sam u staklenu posudu, pa u njega položila otvoreni plastični okvir uređaja, crnom stranom prema dolje. U njemu se nalaze spužvice između kojih sam stavila filter papir Whatmann, te nitroceluloznu membranu koju sam prethodno namočila u redestiliranoj vodi. Po završetku elektroforeze, na nitroceluloznu membranu sam položila gel, preklopila ga drugim filter papirom i spužvicom te preklopila i učvrstila okvir uređaja. Treba paziti da prilikom preklapanja ne ostanu mjehurići zraka između gela i membrane jer na tim mjestima neće doći do prijenosa proteina s gela na membranu. Dva plastična okvira sa gelom i membranom stavila sam u kadicu *Mini PROTEAN® Tetra Cell* (Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD) na način da su membrane bile okrenute prema pozitivnoj elektrodi. Kadica je do vrha bila ispunjena puferom za prijenos (28 mM Tris, 192 mM glicin, 10% (v/v) metanol). Prijenos je trajao jedan sat na 60 V. Poslije prijenosa membrane sam obojala bojom *Rouge Ponceau S* (reverzibilno boji proteine), isprala u destiliranoj vodi i grafitnom olovkom ucrtala biljege molekulskih masa. Membrane sam zatim odbojila u 25 mL pufera TBS (TBS; 50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) i jedan sat inkubirala u 30 mL otopine A (500 mL pufera PBS, 1% Tween 20 i 2% mlijeka u prahu (w/v) za protutijela anti-

APX, -CAT i -SOD, odnosno 5% (w/v) mlijeka u prahu za protutijelo anti-peroksidazu iz hrena (HRP)). Potom sam membrane inkubirala u 30 mL otopine A uz dodatak primarnih protutijela (Tablica 3.) preko noći na 4 °C. Slijedeći dan membrane sam isprala 3 puta po 10 minuta s 20 mL otopine A i inkubirala ih 60 minuta u otopini A uz dodatak 3 µL sekundarnih protutijela (Tablica 3.). Zatim sam membrane isprala dva puta po 10 minuta sa 20 mL otopine B (pufer PBS -pufer i 1% Tween 20) i inkubirala ih u otopinama za kemiluminiscenciju (*ECL Western Blotting Substrate*, Promega za CAT i HRP, te *WesternSure Chemiluminescent Western Blotting reagent*, LI-COR Biosciences za APX i SOD). Membrane su na kraju skenirane na uređaju za kemiluminiscenciju *C-DiGit® Blot Scanner* (LI-COR, Bad Homburg, Njemačka).

**Tablica 3.** Prikaz protutijela i njihovih razrjeđenja korištenih za imunodetekciju antioksidacijskih enzima

Analizirani enzimi	Primarno protutijelo	Razrjeđenje	Sekundarno protutijelo	Razrjeđenje
<b>APX</b>	Poliklonalno protutijelo kunićji anti-APX ( <i>rabbit polyclonal</i> ) (Agrisera, Švedska)	1:1000	anti-kunićji IgG-HRP (Agrisera, Švedska)	1:30000
<b>CAT</b>	Poliklonalno protutijelo kunićji anti-CAT ( <i>rabbit polyclonal</i> ) (Agrisera, Švedska)	1:1000	anti-kunićji IgG-HRP (Agrisera, Švedska)	1:30000
<b>SOD</b>	Poliklonalno protutijelo kunićji anti-Cu/Zn SOD ( <i>rabbit polyclonal</i> ) (Agrisera, Švedska)	1:1000	anti-kunićji IgG-HRP (Agrisera, Švedska)	1:30000
<b>HRP</b>	Poliklonalno protutijelo ovčji anti-HRP ( <i>sheep polyclonal</i> ) (Agrisera, Švedska)	1:2000	anti-kunićji IgG-HRP (Agrisera, Švedska)	1:30000

### **3.3 Statistička obrada podataka**

Dobiveni podaci prikazani su kao srednja vrijednost 6 replika  $\pm$  standardne pogreške. Podatke sam statistički obradila računalnim programom Statistica 12.0 (Start Soft Inc., SAD) za analizu varijance (*ANalysis Of VAriance* – ANOVA), nakon čega sam provela post-hoc Duncan test. Pri tumačenju statistički obrađenih rezultata značajnom sam smatrala razliku  $p \leq 0,05$ .



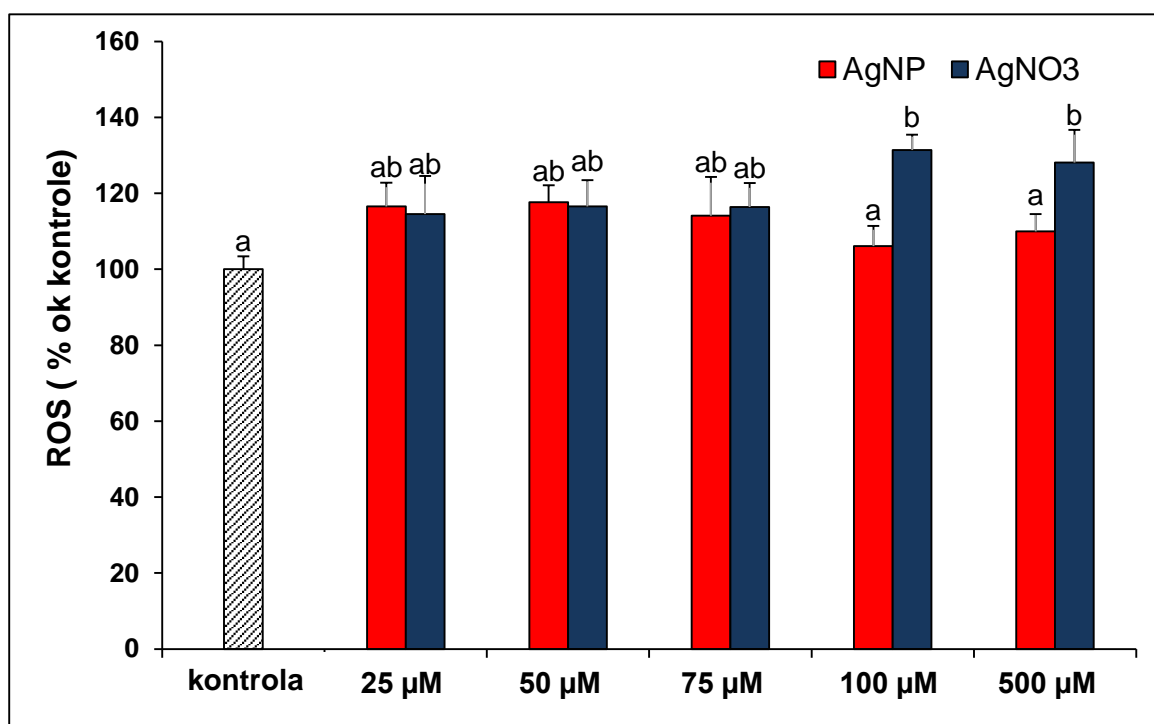
**REZULTATI**

## 4. REZULTATI

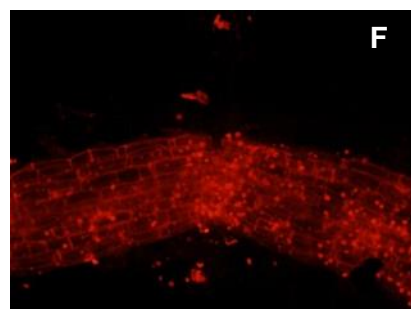
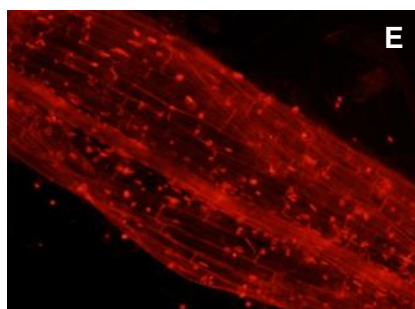
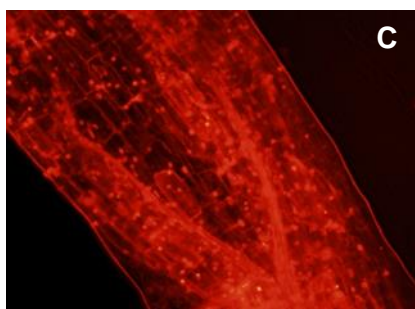
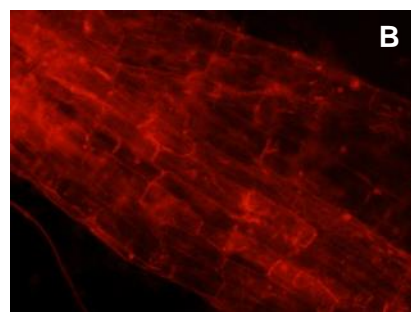
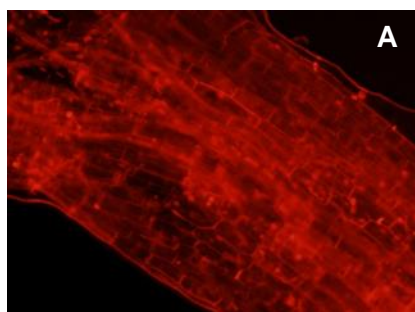
### 4.1. Dihidroetidij test

Utvrđivanje razine oksidacijskog stresa u korijenju i listu biljaka duhana izloženih AgNP i AgNO<sub>3</sub> omogućila je reakcija ROS-a s dihidroetidijem (Slike 2,3,5 i 6).

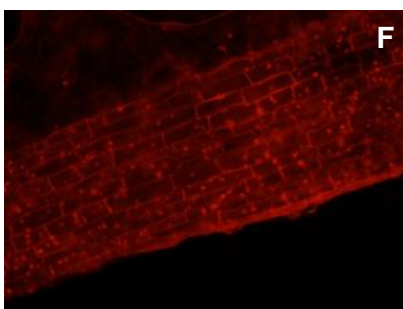
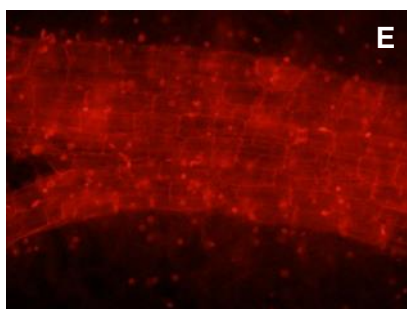
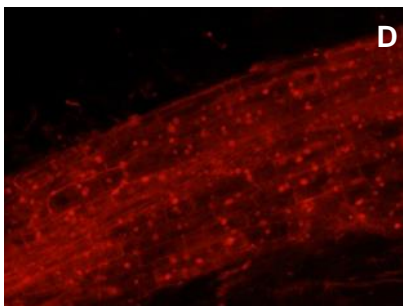
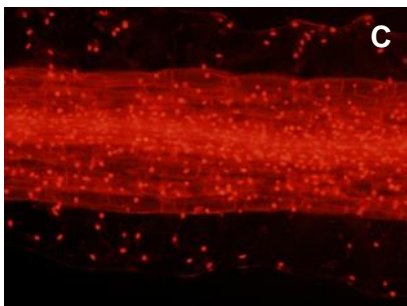
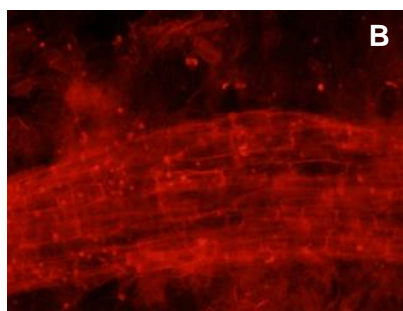
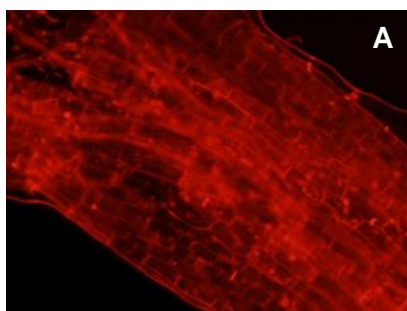
Korijenje biljaka duhana izloženo djelovanju AgNP i AgNO<sub>3</sub> pokazalo je značajan porast razine ROS-a samo pri tretmanima sa 100 i 500 µM AgNO<sub>3</sub> u odnosu na kontrolu (Slika 1.).



Slika 1. Razina ROS-a u korijenju biljaka duhana koje su 7 dana bile izložene tretmanima sa AgNP i AgNO<sub>3</sub>. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost 6 replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ , Duncan test).

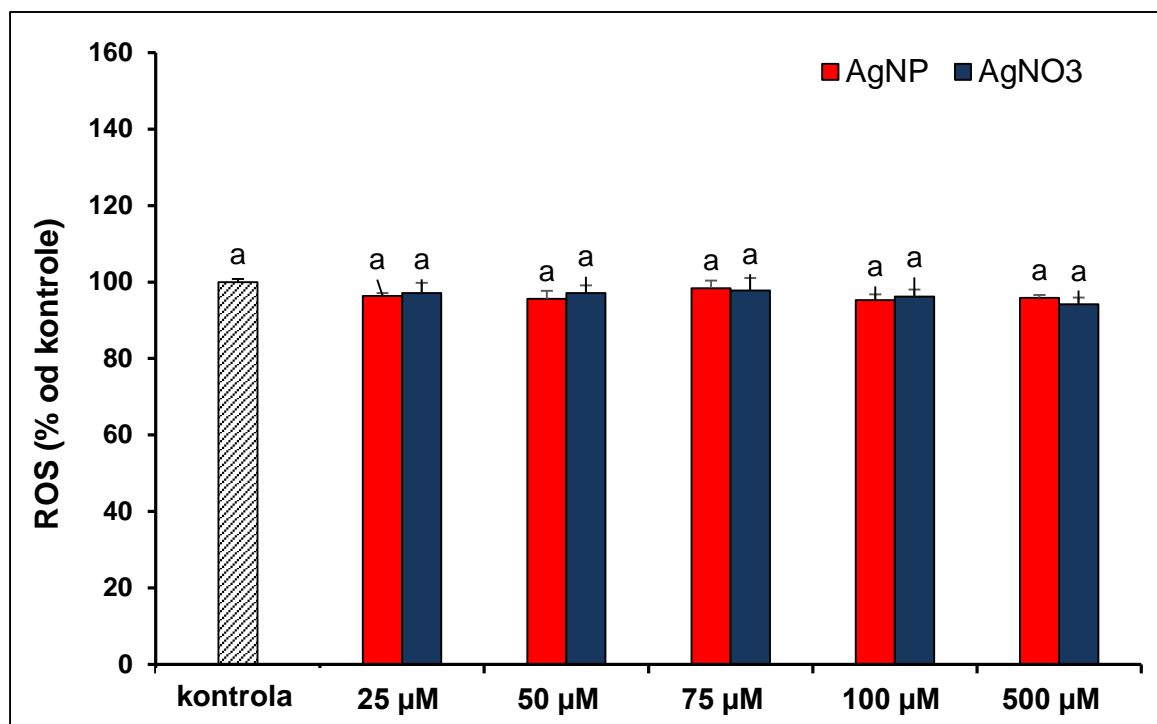


Slika 2. Primjeri analiziranih fotografija pri određivanju razine ROS u korijenu biljaka duhana koje su 7 dana bile izložene tretmanima sa AgNP. Fotografije su snimljene pri povećanju od 400x. A – kontrola, B – 25  $\mu$ M, C – 50  $\mu$ M, D – 75  $\mu$ M, E – 100  $\mu$ M, F – 500  $\mu$ M AgNP.

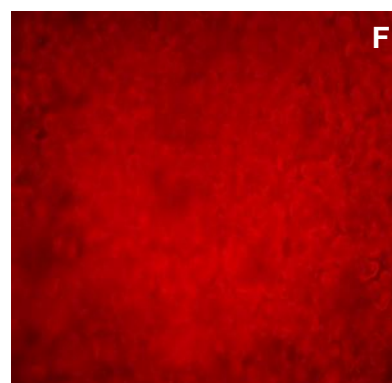
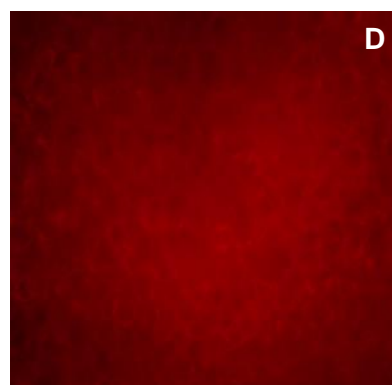
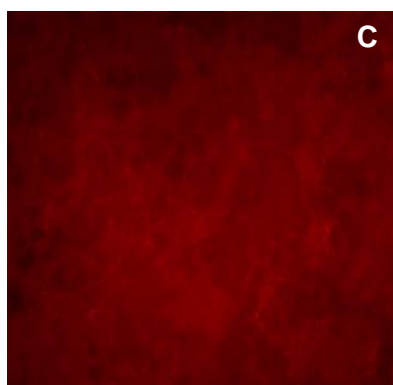
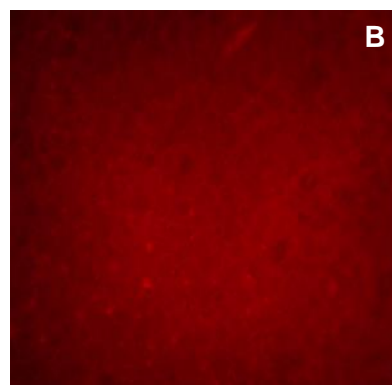
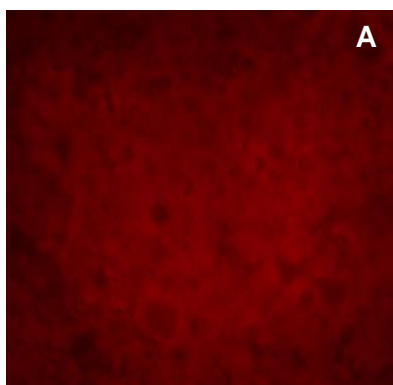


Slika 3. Primjeri analiziranih fotografija pri određivanju razine ROS u korijenu biljaka duhana koje su 7 dana bile izložene tretmanima sa AgNO<sub>3</sub>. Fotografije su snimljene pri povećanju od 400x. A – kontrola, B – 25 µM, C – 50 µM, D – 75 µM, E – 100 µM, F – 500 µM AgNO<sub>3</sub>.

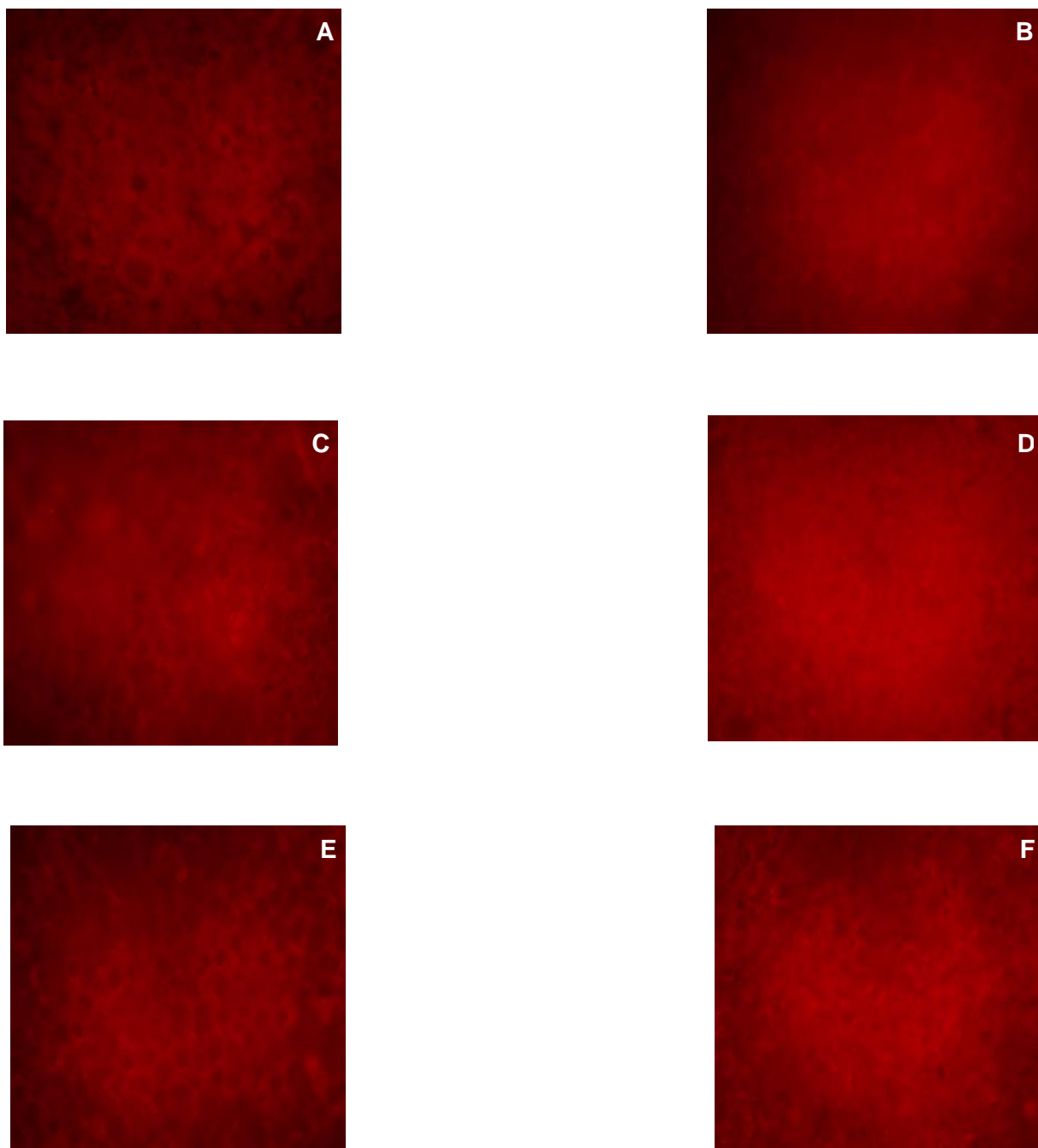
U listovima biljaka duhana vrijednost razine ROS-a u svim tretmanima bila je jednaka vrijednostima kontrole (Slika 4.).



Slika 4. Razina ROS-a u listovima biljaka duhana koje su 7 dana bile izložene tretmanima sa AgNP i AgNO<sub>3</sub>. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ , Duncan test).



Slika 5. Primjeri analiziranih fotografija pri određivanju razine ROS u listovima biljaka duhana koje su 7 dana bile izložene tretmanima sa AgNP. Fotografije su snimljene pri povećanju od 400x. A – kontrola, B – 25  $\mu$ M, C – 50  $\mu$ M, D – 75  $\mu$ M, E – 100  $\mu$ M, F – 500  $\mu$ M AgNP.

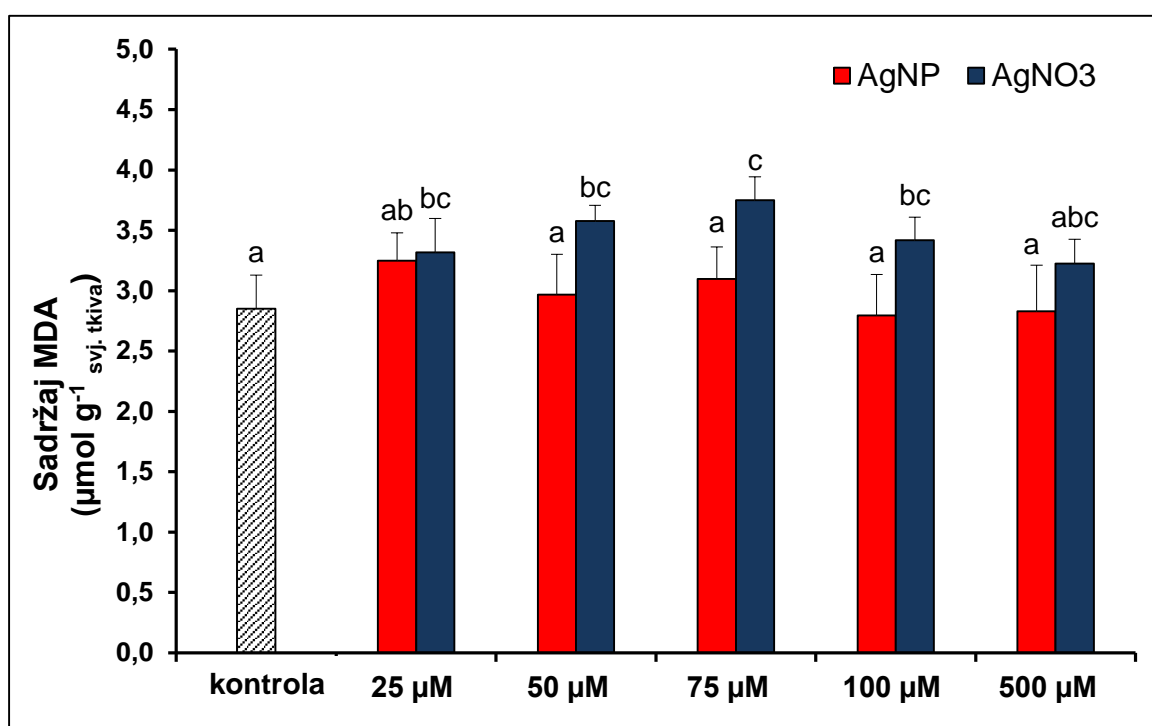


Slika 6. Primjeri analiziranih fotografija pri određivanju razine ROS u listovima biljaka duhana koje su 7 dana bile izložene tretmanima sa  $\text{AgNO}_3$ . Fotografije su snimljene pri povećanju od 400x. A – kontrola, B – 25  $\mu\text{M}$ , C – 50  $\mu\text{M}$ , D – 75  $\mu\text{M}$ , E – 100  $\mu\text{M}$ , F – 500  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ .

#### 4.2. Sadržaj MDA

Razinu lipidne peroksidacije u korijenu i listu duhana izmjerila sam preko sadržaja malondialdehida (MDA), jednog od pokazatelja oksidacijskog stresa.

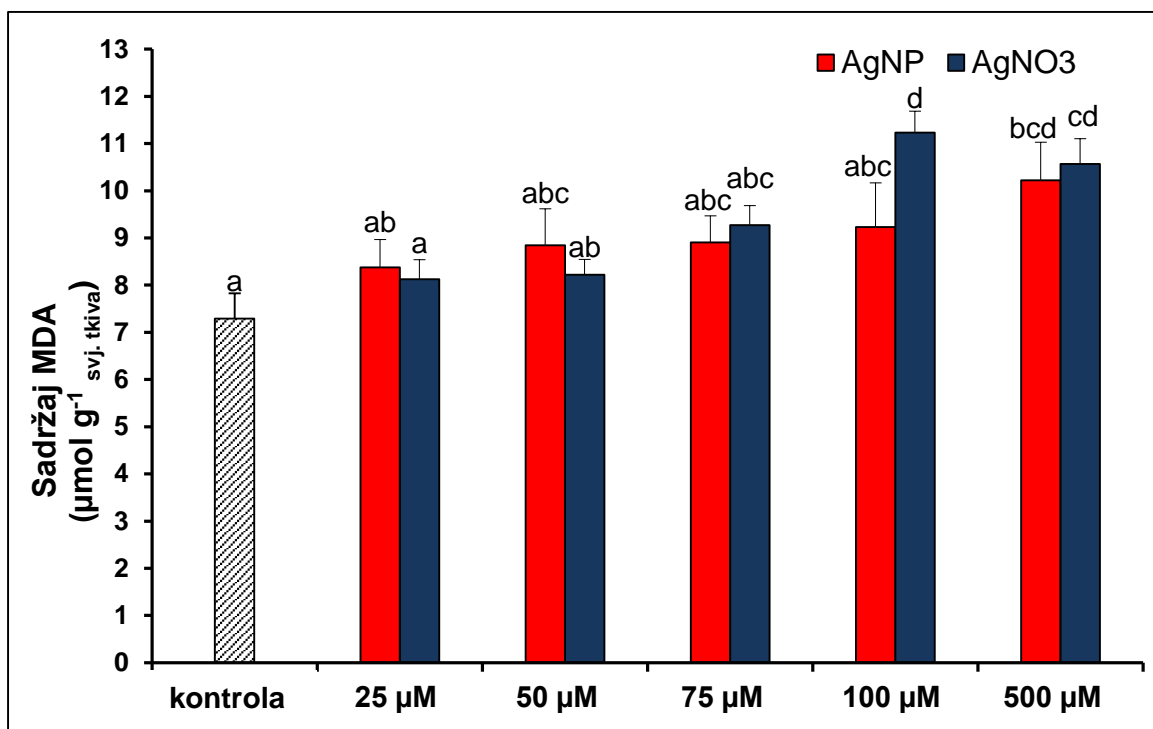
U korijenu biljaka duhana izloženog djelovanju AgNP nije primjećena razlika u porastu sadržaja MDA u odnosu na kontrolu (Slika 7.). Značajni porast razine lipidne peroksidacije zabilježen je u korijenu biljaka duhana izloženih djelovanju AgNO<sub>3</sub>, iako to nije statistički značajno nakon tretmana s najvećom koncentracijom 500 µM AgNO<sub>3</sub> u odnosu na kontrolu. Statistički značajno povećanje sadržaja MDA u tretmanima s AgNO<sub>3</sub> koji su uspoređeni sa odgovarajućim AgNP tretmanima je pronađeno pri koncentracijama od 50, 70 i 100 µM (Slika 7.).



Slika 7. Sadržaj MDA u korijenu biljaka duhana koje su 7 dana bile izložene tretmanima sa AgNP i AgNO<sub>3</sub>. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost 6 replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju (  $p \leq 0,05$ , Duncan test).



U listovima biljaka duhana tretiranih s AgNP zabilježeno je povećanje sadržaja MDA samo u tretmanu s najvećom koncentracijom (500  $\mu\text{M}$ ), dok je u tretmanima s  $\text{AgNO}_3$  povećanje sadržaja MDA prisutno pri koncentracijama od 100 i 500  $\mu\text{M}$ . Statistički značajno povećanje sadržaja MDA u tretmanima s  $\text{AgNO}_3$  koji su uspoređeni sa odgovarajućim tretmanima s AgNP vidljivo je pri koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$  (Slika 8.).

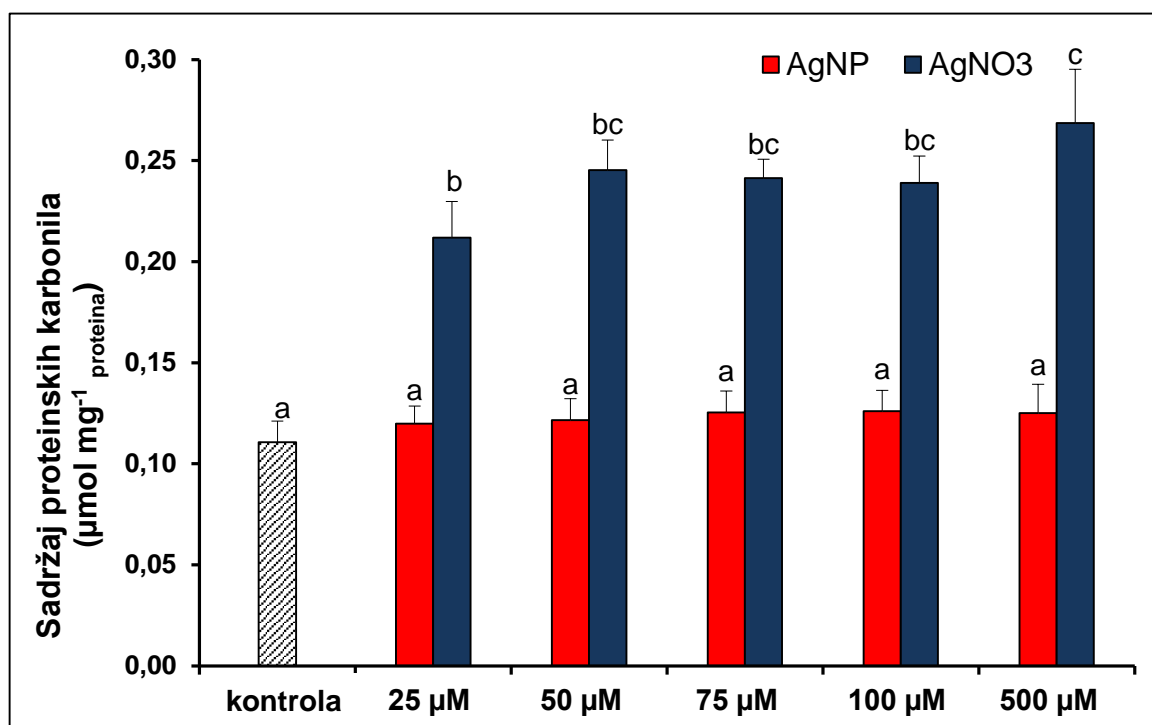


Slika 8. Sadržaj MDA u listovima biljaka duhana koje su 7 dana bile izložene tretmanima sa AgNP i  $\text{AgNO}_3$ . Rezultati predstavljaju srednju vrijednost 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ , Duncan test).

#### 4.3. Sadržaj proteinskih karbonila

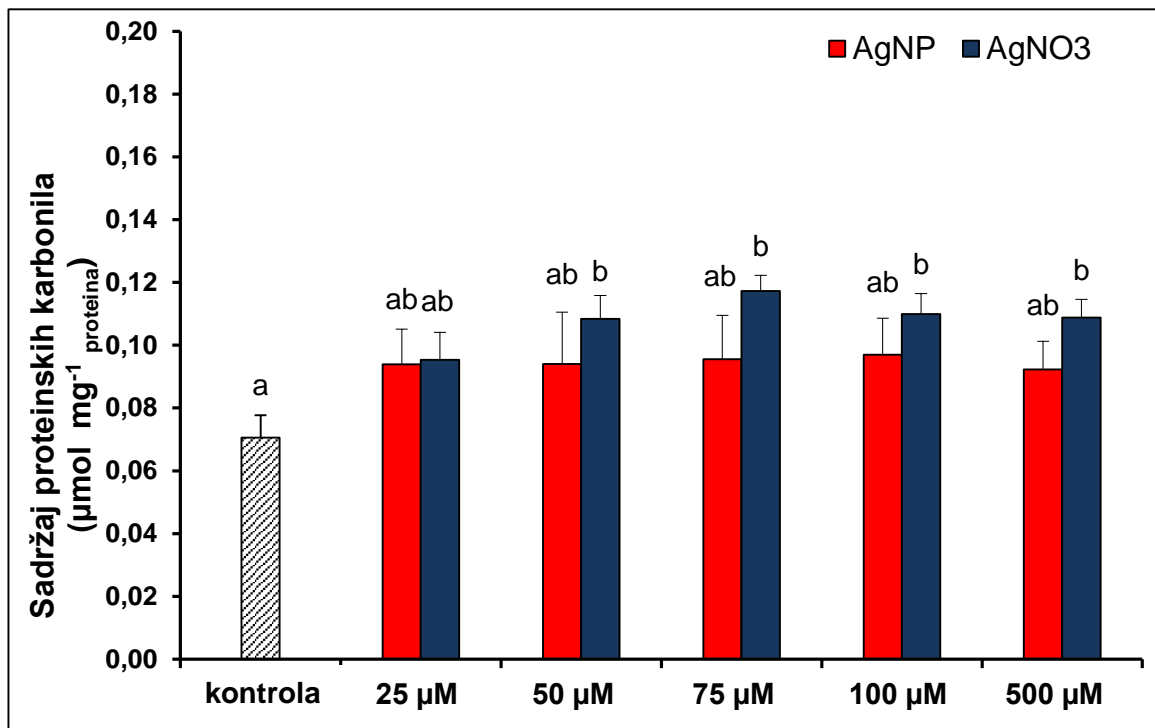
Sadržaj proteinskih karbonila mjerila sam kako bih odredila razinu oksidacije proteina u korijenu i listu biljaka duhana.

Korijenje biljaka duhana izloženo djelovanju AgNP nije pokazalo statistički značajne promjene u sadržaju proteinskih karbonila u odnosu na kontrolu (Slika 9.). Sadržaj proteinskih karbonila u korijenju biljaka izloženih djelovanju AgNO<sub>3</sub> značajno je narastao pri svim ispitanim koncentracijama u odnosu na kontrolu i odgovarajućim AgNP tretmanima počevši već od najniže koncentracije od 25 µM (Slika 9).



Slika 9. Sadržaj proteinskih karbonila u korijenju biljaka duhana koje su 7 dana bile izložene tretmanima sa AgNP i AgNO<sub>3</sub>. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost 6 replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ , Duncan test).

Listovi biljaka duhana izloženi AgNP tretmanima nisu pokazali statistički značajnu promjenu u sadržaju proteinskih karbonila u odnosu na kontrolu (Slika 10.). U biljaka tretiranih s AgNO<sub>3</sub> sadržaj proteinskih karbonila u listovima je bio povišen u svim tretmanima u odnosu na kontrolu s izuzetkom najniže koncentracije od 25 µM (Slika 10.).

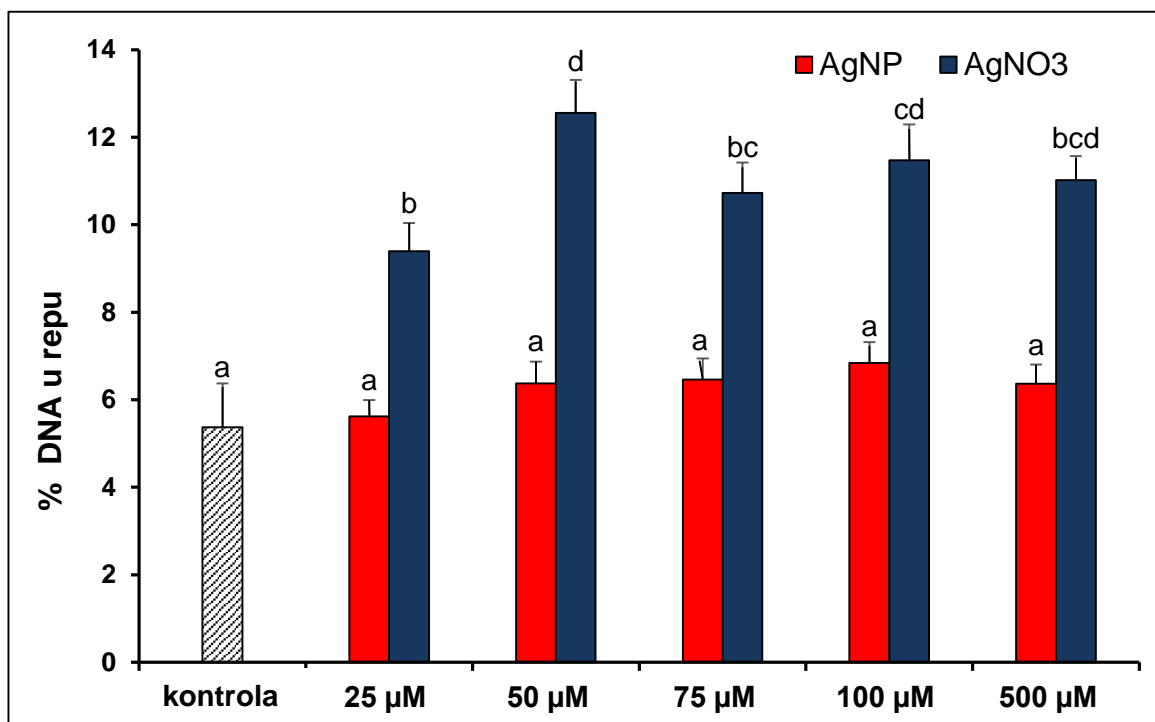


Slika 10. Sadržaj proteinskih karbonila u listovima biljaka duhana koje su 7 dana bile izložene tretmanima sa AgNP i AgNO<sub>3</sub>. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost 6 replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ , Duncan test).

#### 4.4. Comet test

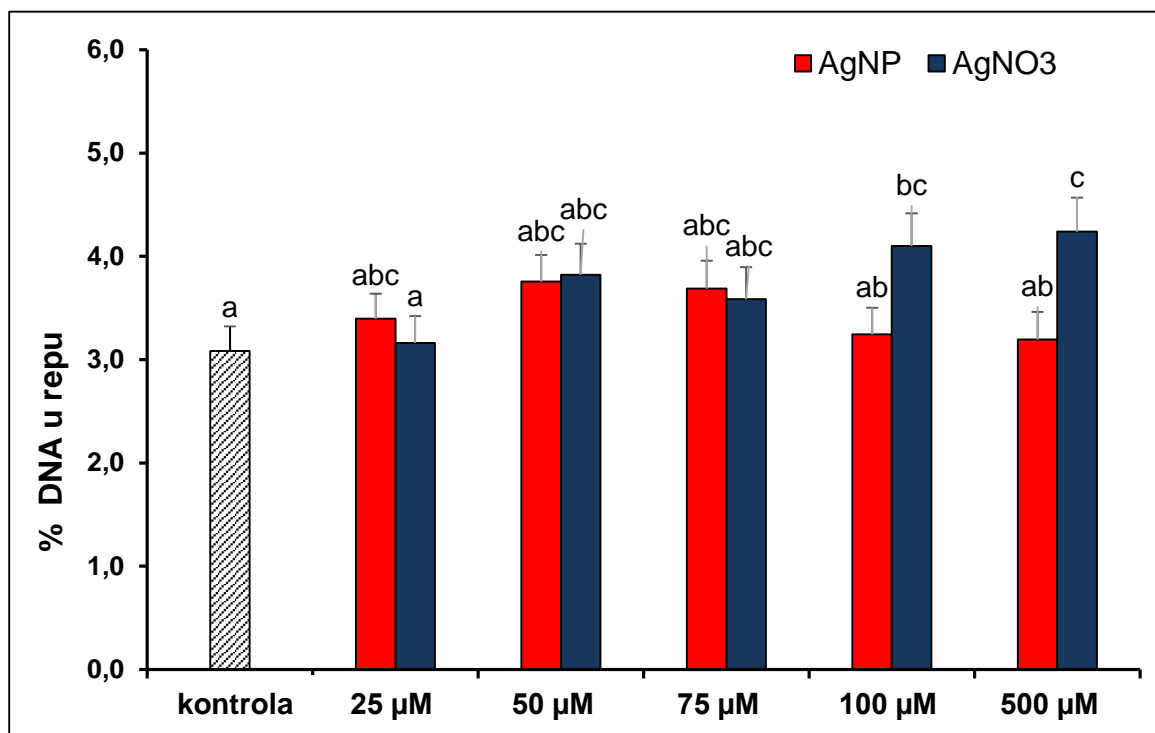
Određivanje razine oštećenja molekule DNA mjerenjem postotka DNA u repu, izvela sam pomoću Comet testa.

Tretmani s AgNP kojima su bili izložene biljke duhana nisu izazvali pojačano oštećenje molekule DNA u korijenu u odnosu na kontrolu (Slika 11.). Korijenje biljaka duhana izloženih tretmanima s AgNO<sub>3</sub> pokazalo je statistički značajno oštećenje molekule DNA u odnosu na kontrolu u svim tretmanima (Slika 11.).



Slika 11. Postotak DNA u repu u korijenu biljaka duhana koje su 7 dana bile izložene tretmanima sa AgNP i AgNO<sub>3</sub>. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ , Duncan test).

Postotak oštećenja DNA u listovima biljaka duhana izloženih tretmanima s AgNP i AgNO<sub>3</sub> bio je statistički značajno povećan u odnosu na kontrolu samo pri koncentracijama od 100 i 500 µM AgNO<sub>3</sub> (Slika 12.).

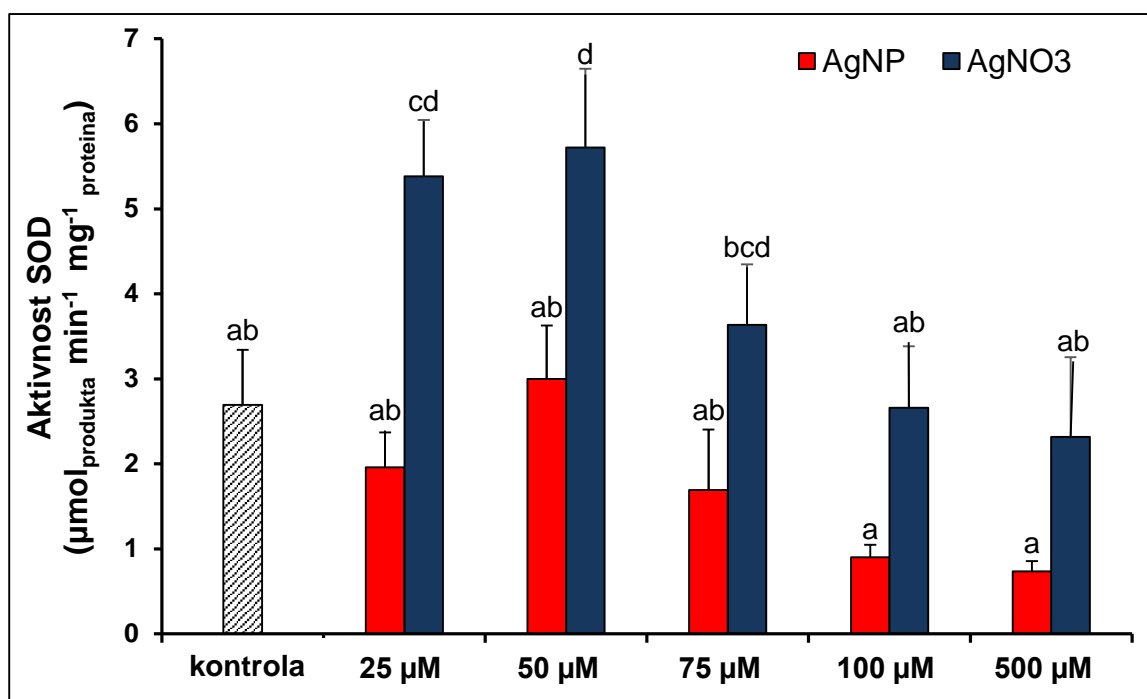


Slika 12. Postotak DNA u repu u listovima biljaka duhana koje su 7 dana bile izložene tretmanima sa AgNP i AgNO<sub>3</sub>. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost 6 replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ , Duncan test).

## 4.5. Aktivnost antioksidacijskih enzima

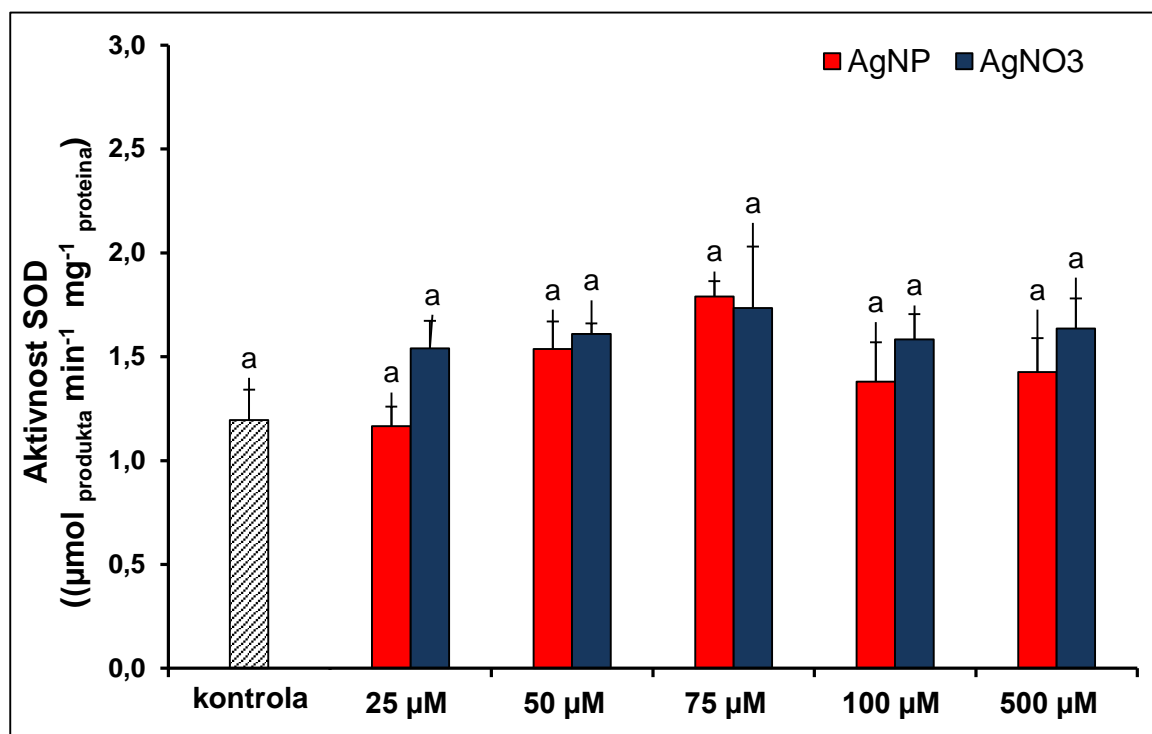
### 4.5.1. Aktivnost superoksid dismutaze

U korijenu biljaka duhana nakon tretmana s AgNP nisu zabilježene značajne promjene u aktivnosti SOD, iako su pri koncentracijama od 100 i 500  $\mu\text{M}$  zabilježene niže vrijednosti (Slika 13.). Nakon tretmana s  $\text{AgNO}_3$  zabilježeno je značajno povećanje aktivnosti SOD pri koncentracijama od 25 i 50  $\mu\text{M}$  u odnosu na kontrolu, dok nakon tretmana sa 75  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  aktivnost SOD nije bila statistički značajno različita u odnosu na kontrolu (Slika 13.). Usporedbom tretmana  $\text{AgNO}_3$  sa tretmanima s AgNP odgovarajućih koncentracija vidljivo je statistički značajno povećanje aktivnosti SOD pri koncentracijama od 25 i 50  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  (Slika 13.).



Slika 13. Aktivnost superoksid dismutaze u korijenu biljaka duhana koje su 7 dana bile izložene tretmanima sa AgNP i  $\text{AgNO}_3$ . Rezultati predstavljaju srednju vrijednost 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ , Duncan test).

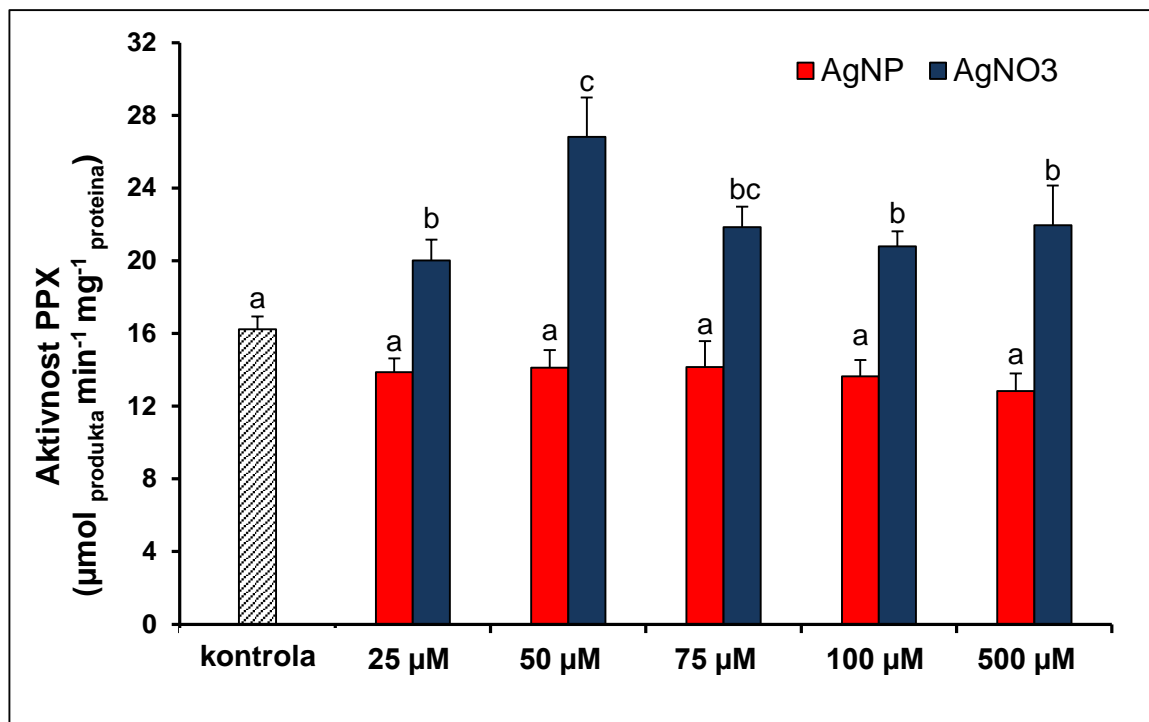
Listovi biljaka duhana, izloženih djelovanju AgNP i AgNO<sub>3</sub>, nisu pokazali statistički značajne promjene u aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu (Slika 14.).



Slika 14. Aktivnost superoksid dismutaze u listovima biljaka duhana koje su 7 dana bile izložene tretmanima sa AgNP i AgNO<sub>3</sub>. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost 6 replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ , Duncan test).

#### 4.5.2. Aktivnost pirogalol peroksidaze

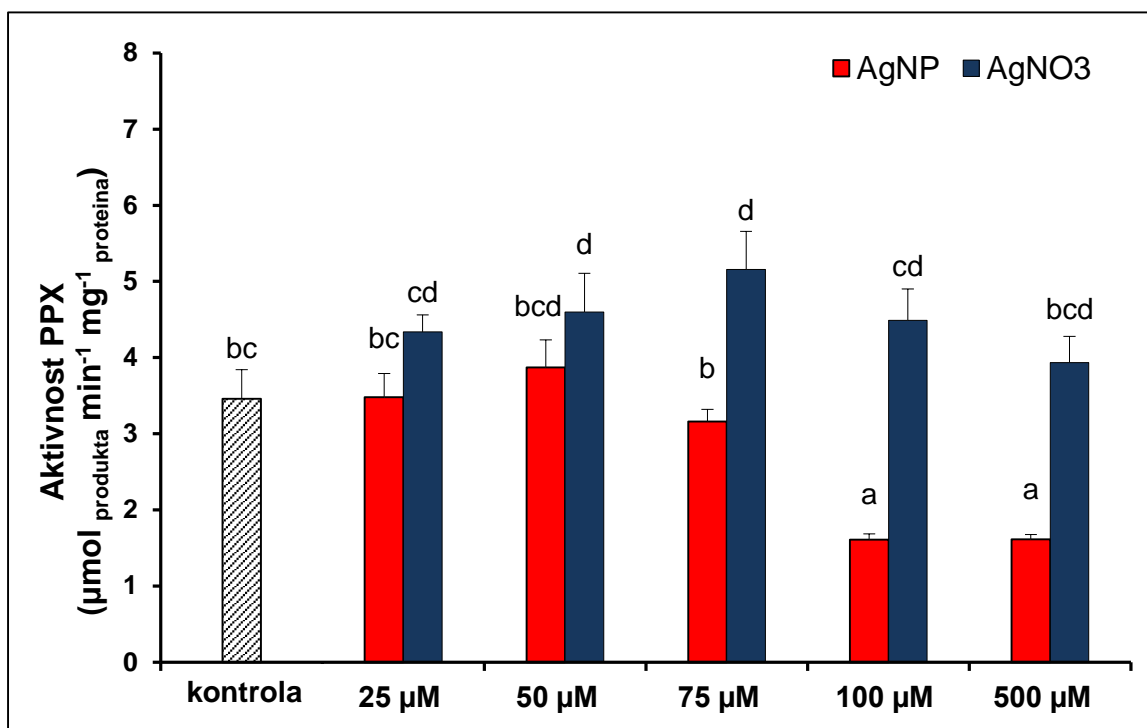
Korijenje biljaka izloženih djelovanju AgNP nije pokazalo statistički značajnu promjenu u aktivnosti PPX niti u jednoj od ispitanih koncentracija (Slika 15.). U korijenju biljaka duhana izloženih AgNO<sub>3</sub> aktivnost PPX se povećala u svim tretmanima u odnosu na kontrolu i odgovarajuće tretmane s AgNP (Slika 15.).



Slika 15. Aktivnost pirogalol peroksidaze u korijenju biljaka duhana koje su 7 dana bile izložene tretmanima sa AgNP i AgNO<sub>3</sub>. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost 6 replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ , Duncan test).



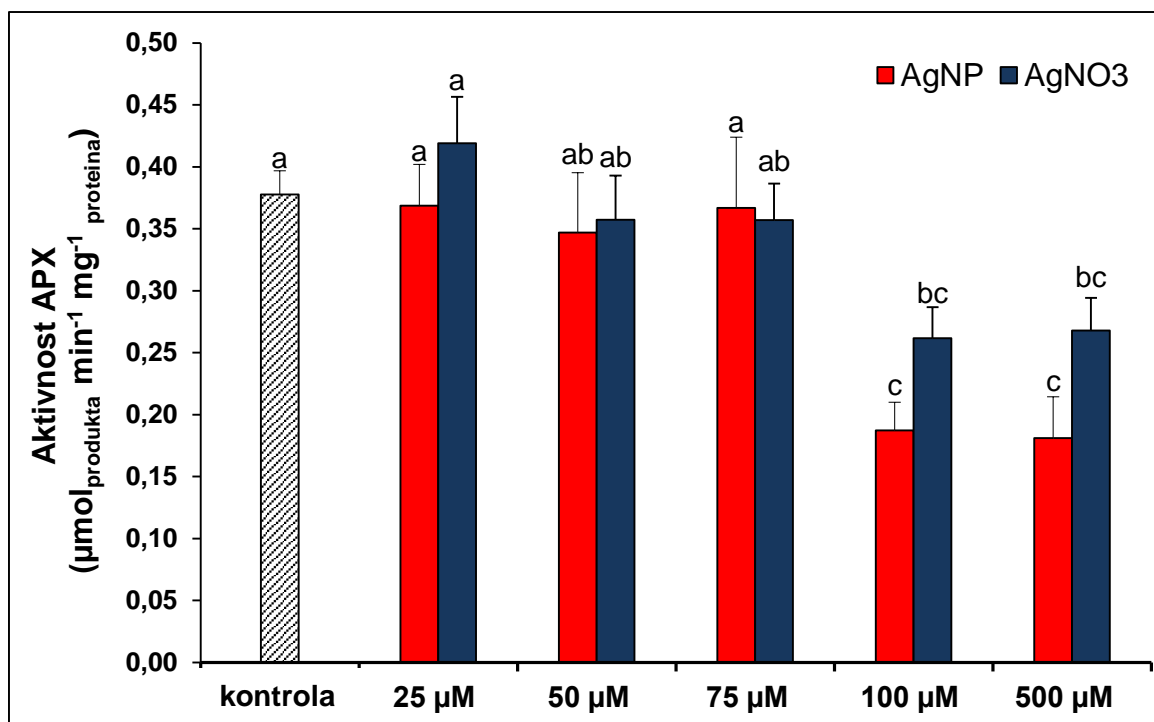
U listovima biljaka duhana izloženih tretmanima s AgNP aktivnost PPX se smanjila pri najvišim koncentracijama (100 i 500  $\mu\text{M}$ ) u odnosu na kontrolu (Slika 16.). Aktivnost PPX u listovima biljaka izloženih  $\text{AgNO}_3$  se povećala u svim tretmanima u usporedbi s kontrolom, a statistički značajno povećanje zabilježeno je pri koncentracijama od 50 i 75  $\mu\text{M}$  (Slika 16.).



Slika 16. Aktivnost pirogallol peroksidaze u listovima biljaka duhana koje su 7 dana bile izložene tretmanima sa AgNP i  $\text{AgNO}_3$ . Rezultati predstavljaju srednju vrijednost 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ , Duncan test).

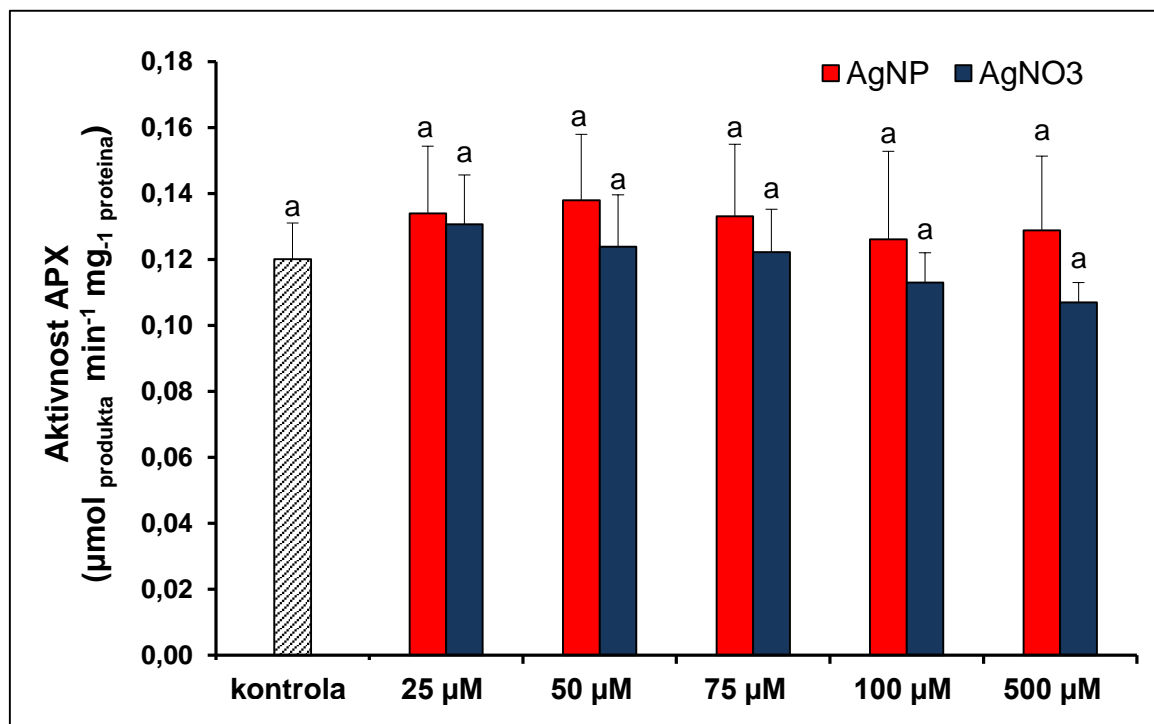
#### 4.5.3. Aktivnost askorbat peroksidaze

Tretmani s AgNP i AgNO<sub>3</sub> pokazali su sličan utjecaj na aktivnost enzima APX u korijenju biljaka duhana izloženih istim koncentracijama. Pri nižim koncentracijama AgNP i AgNO<sub>3</sub> (25, 50 i 75 µM) zabilježene su jednake vrijednosti kao i u kontroli (Slika 17.). Pri višim koncentracijama AgNP i AgNO<sub>3</sub> (100 i 500 µM) aktivnost APX se smanjila, a to smanjenje je bilo više izraženo u tretmanima s AgNP nego u tretmanima s AgNO<sub>3</sub> (Slika 17.).



Slika 17. Aktivnost askorbat peroksidaze u korijenju biljaka duhana koje su 7 dana bile izložene tretmanima sa AgNP i AgNO<sub>3</sub>. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost 6 replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ , Duncan test).

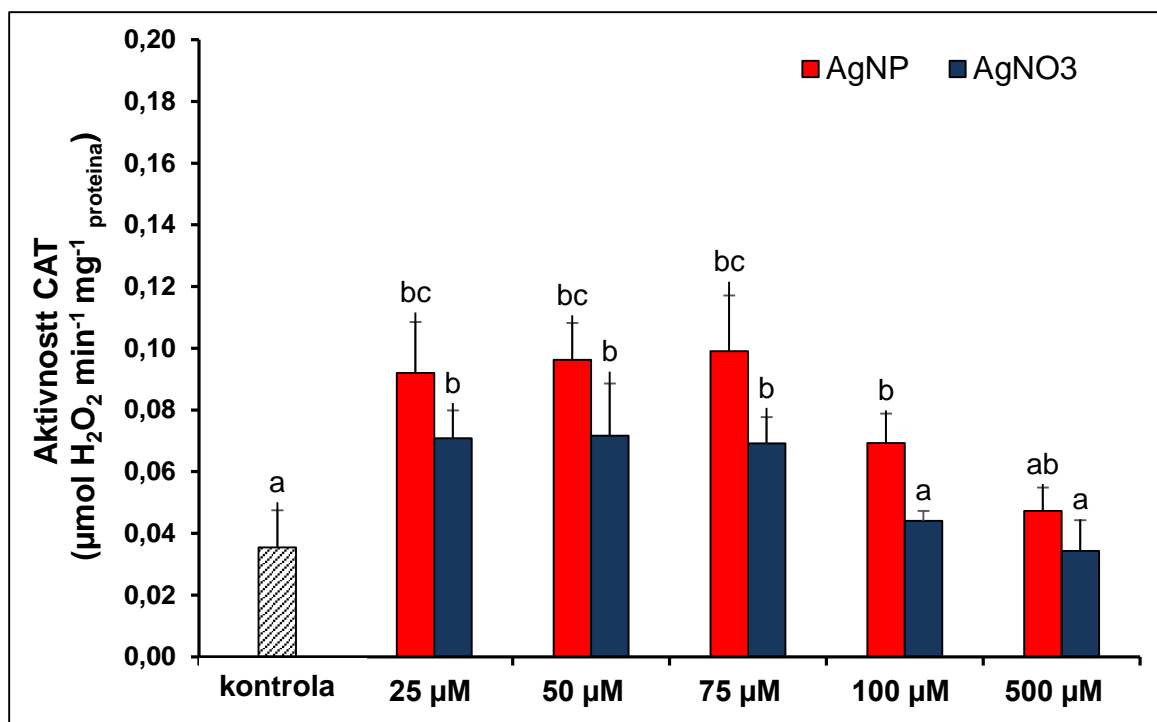
Listovi biljaka duhana izloženih tretmanima s AgNP i AgNO<sub>3</sub> nisu pokazali statistički značajnu promjenu u aktivnosti APX u odnosu na kontrolu (Slika 18.).



Slika 18. Aktivnost askorbat peroksidaze u listovima biljaka duhana koje su 7 dana bile izložene tretmanima sa AgNP i AgNO<sub>3</sub>. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost 6 replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ , Duncan test).

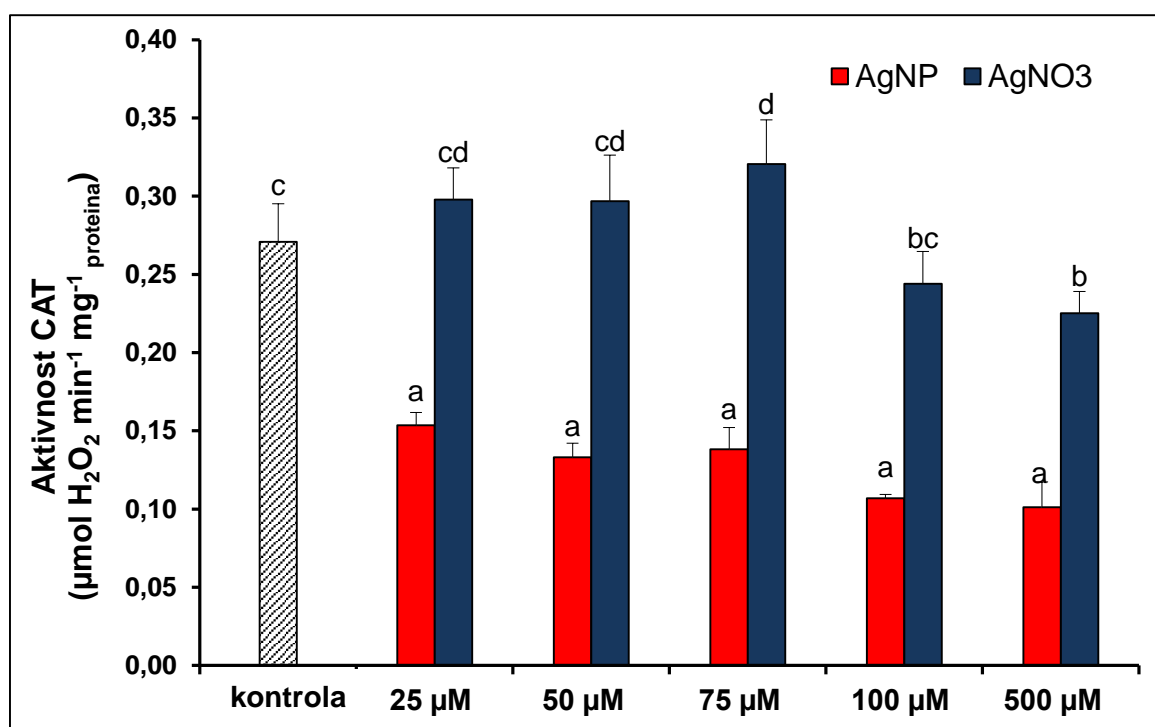
#### 4.5.4. Aktivnost katalaze

Korijenje biljaka duhana izloženih tretmanima s AgNP i AgNO<sub>3</sub> pokazalo je povećanje aktivnosti CAT, koje je bilo statistički značajno pri koncentracijama od 25, 50, 75 i 100 µM AgNP te 25, 50 i 75 µM AgNO<sub>3</sub> (Slika 19.)



Slika 19. Aktivnost katalaze u korijenju biljaka duhana koje su 7 dana bile izložene tretmanima sa AgNP i AgNO<sub>3</sub>. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost 6 replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ , Duncan test).

U listovima biljaka duhana koje su izložene djelovanju AgNP aktivnost CAT pokazala je statistički značajno smanjenje u svim tretmanima u odnosu na kontrolu. Utjecaj AgNO<sub>3</sub> na aktivnost CAT ovisila je o primijenjenoj koncentraciji. Niže koncentracije AgNO<sub>3</sub> (25 i 50 µM) nisu imale utjecaj na aktivnost CAT, pri 75 µM AgNO<sub>3</sub> aktivnost se povećala, dok se pri 100 i 500 µM aktivnost smanjila u odnosu na kontrolu (Slika 20.), iako je smanjenje aktivnosti manje izraženo nego u tretmanima s AgNP.

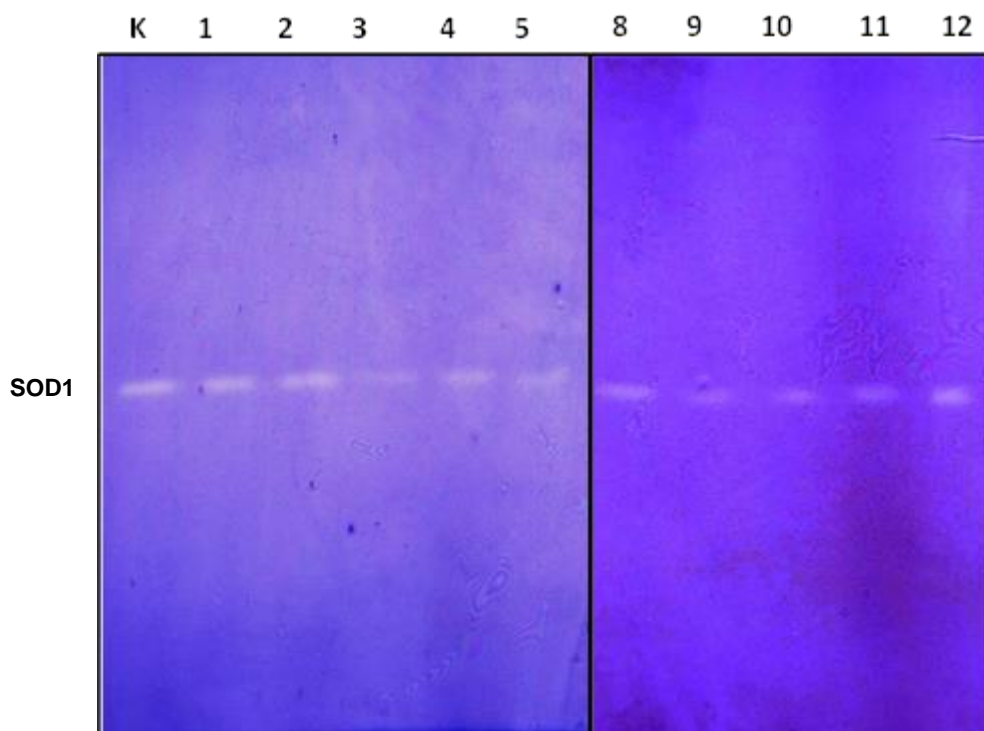


Slika 20. Aktivnost katalaze u listovima biljaka duhana koje su 7 dana bile izložene tretmanima sa AgNP i AgNO<sub>3</sub>. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost 6 replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ , Duncan test).

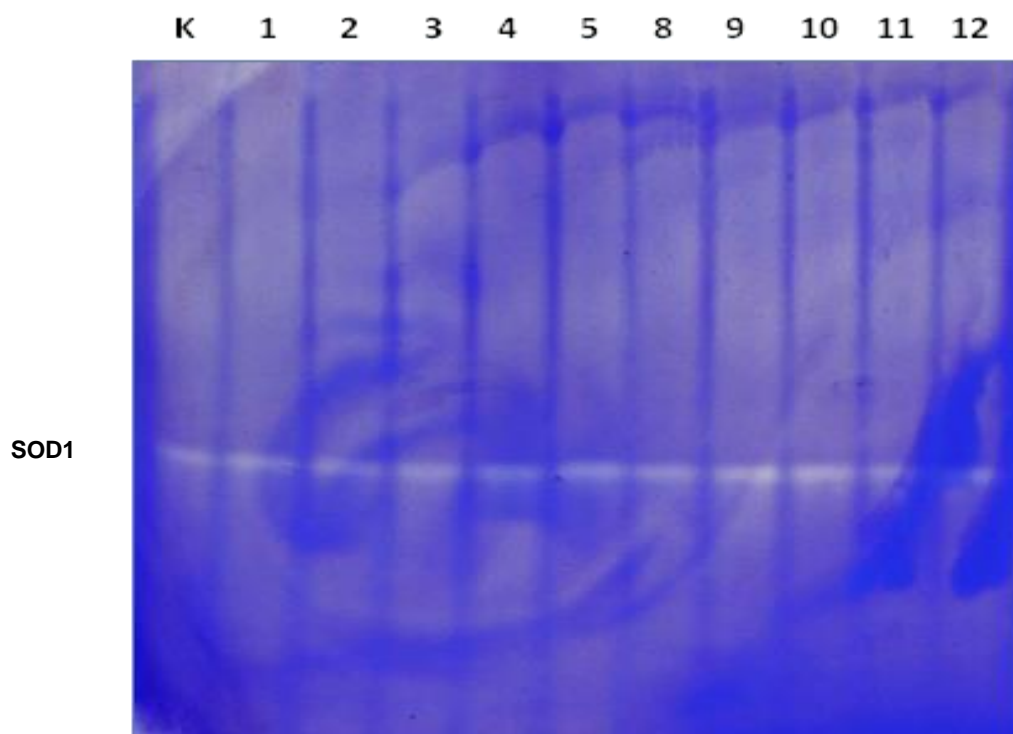
#### 4.6. Aktivnost antioksidacijskih enzima u gelu

##### 4.6.1. Aktivnost superoksid dismutaze

Na slikama 21. i 22. prikazana je aktivnost i izoforme superoksid dismutaze u korijenju i listovima biljaka izloženih djelovanju AgNP i AgNO<sub>3</sub>. Na oba gela vidljiva je samo jedna izoforma ovoga enzima označena sa SOD1, koja je bila jednokog intenziteta u kontroli i svim tretmanima.



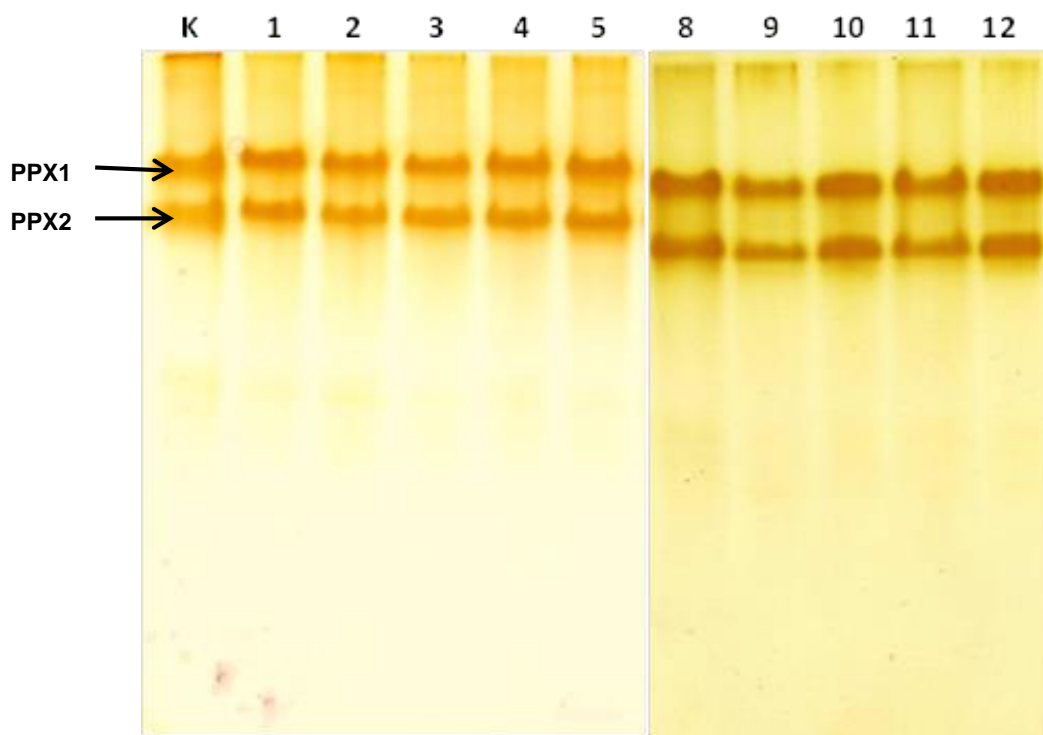
Slika 21. Aktivnost i izoforme superoksid dismutaze u gelu nakon native PAG elektroforeze u korijenju biljaka duhana izloženih 7 dana tretmanima s AgNP i AgNO<sub>3</sub>. K- kontrola, 1 - 25  $\mu$ M AgNP, 2 - 50  $\mu$ M AgNP, 3 - 75  $\mu$ M AgNP, 4 - 100  $\mu$ M AgNP, 5 - 500  $\mu$ M AgNP, 8 - 25  $\mu$ M AgNO<sub>3</sub>, 9 - 50  $\mu$ M AgNO<sub>3</sub>, 10 - 75  $\mu$ M AgNO<sub>3</sub>, 11 - 100  $\mu$ M AgNO<sub>3</sub>, 12 - 500  $\mu$ M AgNO<sub>3</sub>.



Slika 22. Aktivnost i izoforme superoksid dismutaze u gelu nakon native PAG elektroforeze u listovima biljaka duhana izloženih 7 dana tretmanima s AgNP i AgNO<sub>3</sub>. K - kontrola, 1 - 25 μM AgNP, 2 - 50 μM AgNP, 3 - 75 μM AgNP, 4 - 100 μM AgNP, 5 - 500 μM AgNP, 8 - 25 μM AgNO<sub>3</sub>, 9 - 50 μM AgNO<sub>3</sub>, 10 - 75 μM AgNO<sub>3</sub>, 11 - 100 μM AgNO<sub>3</sub>, 12 - 500 μM AgNO<sub>3</sub>.

#### 4.6.2. Aktivnost pirogalol peroksidaze

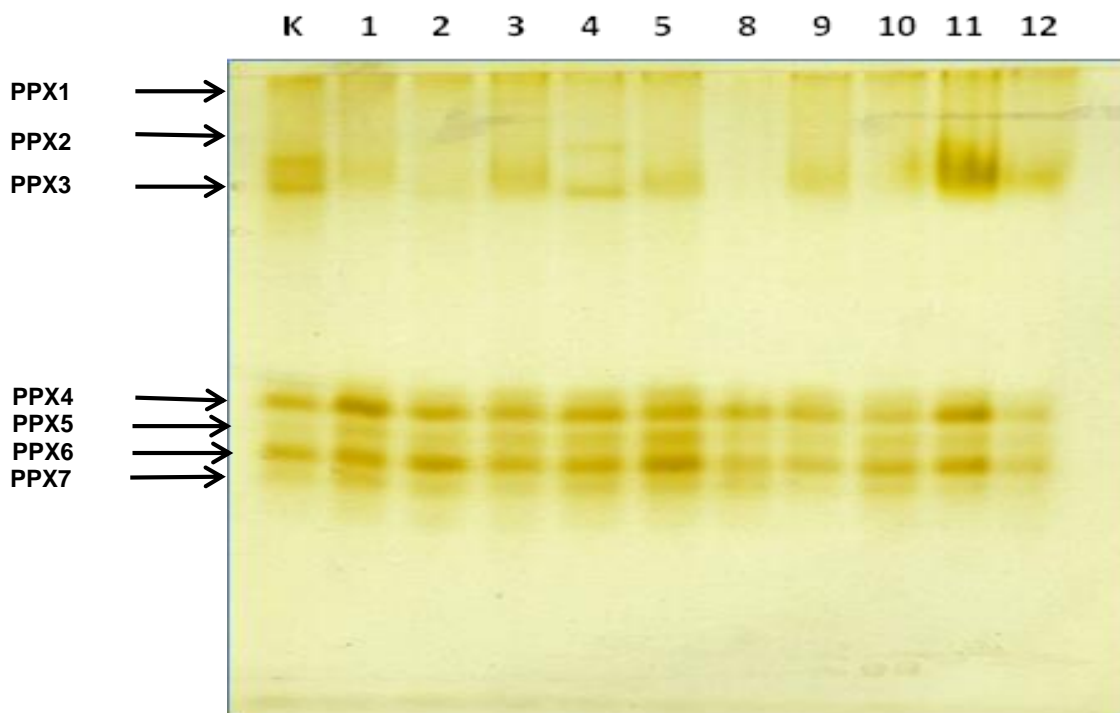
Na slici 23. prikazana je aktivnost i izoforme pirogalol peroksidaze u korijenju biljaka duhana izloženih tretmanima s AgNP i AgNO<sub>3</sub>. U analiziranim uzorcima detektirane su dvije izoforme navedenog enzima, a označene su prema rastućoj pokretljivosti kao PPX1 i PPX2. Nije bilo razlike u broju izoformi između uzoraka tretiranih s AgNP i AgNO<sub>3</sub>, no uzorci su se međusobno razlikovali po intenzitetu obojenja pojedinih vrpca. Naime, korijenje biljaka tretirane s AgNP i AgNO<sub>3</sub> pokazalo je jači intenzitet izoformi PPX1 i PPX2 u svim tretmanima u odnosu na kontrolu.



Slika 23. Aktivnost i izoforme pirogalol peroksidaze u gelu nakon native PAG elektroforeze u korijenju biljaka duhana izloženih 7 dana tretmanima s AgNP i AgNO<sub>3</sub>. K - kontrola, 1 - 25 μM AgNP, 2 - 50 μM AgNP, 3 - 75 μM AgNP, 4 - 100 μM AgNP, 5 - 500 μM AgNP, 8 - 25 μM AgNO<sub>3</sub>, 9 - 50 μM AgNO<sub>3</sub>, 10 - 75 μM AgNO<sub>3</sub>, 11 - 100 μM AgNO<sub>3</sub>, 12 - 500 μM AgNO<sub>3</sub>.

Aktivnost i izoforme pirogalol peroksidaze u listovima biljaka izloženih djelovanju AgNP i AgNO<sub>3</sub> prikazana je na slici 24. U analiziranim uzorcima detektirano je sedam izoformi navedenog enzima, koje su prema rastućoj pokretljivosti označene kao PPX1, PPX2, PPX3, PPX4, PPX5, PPX6 i PPX7. Između uzoraka tretiranih s AgNP i AgNO<sub>3</sub> nije bilo razlike u broju izoformi PPX, no u nekim tretmanima se pojedine izoforme bile slabije vidljive ili ih se nije moglo uočiti. Slabiji intenzitet izoforme PPX1 zabilježen je u tretmanima s 50 i 100 μM AgNP. Također vrpce PPX2 i PPX3 nisu bile vidljive u tretmanu s 50 μM AgNP. Izoforme PPX4 do PPX7 imale su jači intenzitet obojenja u svim tretmanima sa AgNP u odnosu na kontrolu. U listovima biljaka izloženih 25 μM AgNO<sub>3</sub> vrpce PPX1, PPX2 i PPX3 bile su vrlo slabo vidljive. Izoforma PPX3 bila je najjačeg intenziteta nakon tretmana s 100 μM AgNO<sub>3</sub>. Intenzitet izoformi PPX4, PPX5, PPX6 i PPX7 bio je slabiji u tretmanima s AgNO<sub>3</sub> nego s AgNP, s iznimkom 100 μM AgNO<sub>3</sub>.

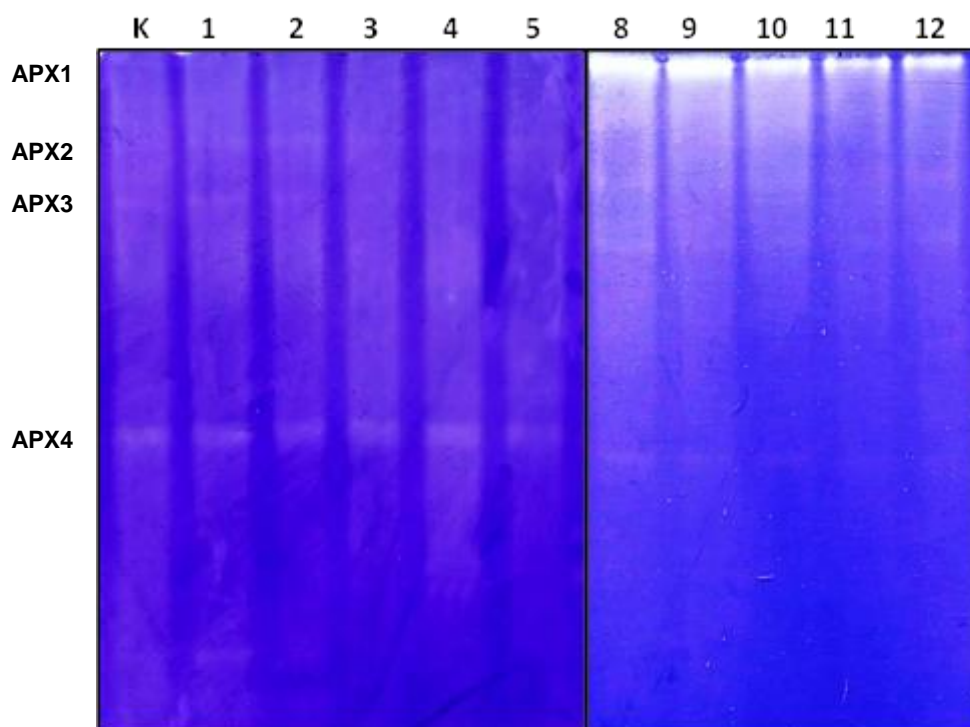




Slika 24. Aktivnost i izoforme pirogalol peroksidaze u gelu nakon native PAG elektroforeze u listovima biljaka duhana izloženih 7 dana tretmanima s AgNP i AgNO<sub>3</sub>. K - kontrola, 1 - 25 μM AgNP, 2 - 50 μM AgNP, 3 - 75 μM AgNP, 4 - 100 μM AgNP, 5 - 500 μM AgNP, 8 - 25 μM AgNO<sub>3</sub>, 9 - 50 μM AgNO<sub>3</sub>, 10 - 75 μM AgNO<sub>3</sub>, 11 - 100 μM AgNO<sub>3</sub>, 12 - 500 μM AgNO<sub>3</sub>.

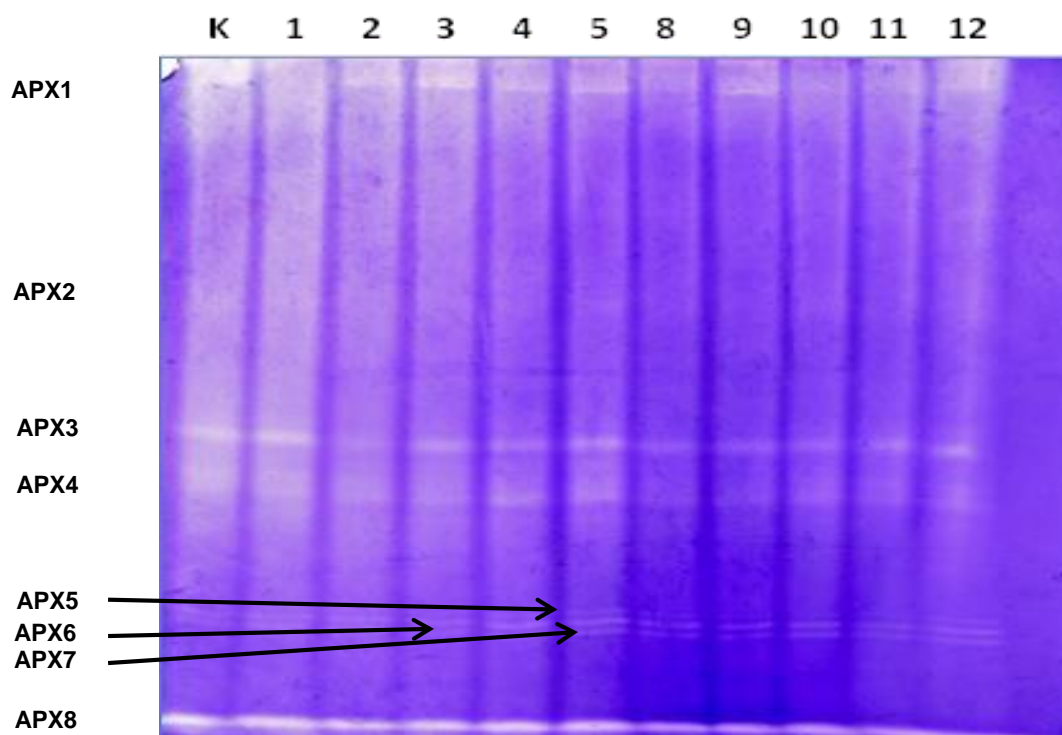
#### 4.6.3. Aktivnost askorbat peroksidaze

Na slici 25. prikazana je aktivnost i izoforme enzima askorbat peroksidaze u korijenju biljaka duhana izloženih djelovanju AgNP i AgNO<sub>3</sub>. Vidljive su četiri izoforme ovoga enzima označene kao APX1, APX2, APX3 i APX4. Izoforma APX1 nije bila vidljiva u kontroli niti u tretmanima s AgNP, dok su vrpce APX2 i APX3 bile podjednakog intenziteta u većini tretmana, s iznimkom 100 i 500 μM AgNP u kojima vrpca APX3 nije uočena. Intenzitet izoforme APX4 bio je slabiji nakon tretmana s AgNO<sub>3</sub> u odnosu na AgNP i kontrolu.



Slika 25. Aktivnost i izoforme askorbat peroksidaze u gelu nakon native PAG elektroforeze u korijenju biljaka duhana izloženih 7 dana tretmanima s AgNP i AgNO<sub>3</sub>. K - kontrola, 1 - 25 µM AgNP, 2 - 50 µM AgNP, 3 - 75 µM AgNP, 4 - 100 µM AgNP, 5 - 500 µM AgNP, 8 - 25 µM AgNO<sub>3</sub>, 9 - 50 µM AgNO<sub>3</sub>, 10 - 75 µM AgNO<sub>3</sub>, 11 - 100 µM AgNO<sub>3</sub>, 12 - 500 µM AgNO<sub>3</sub>.

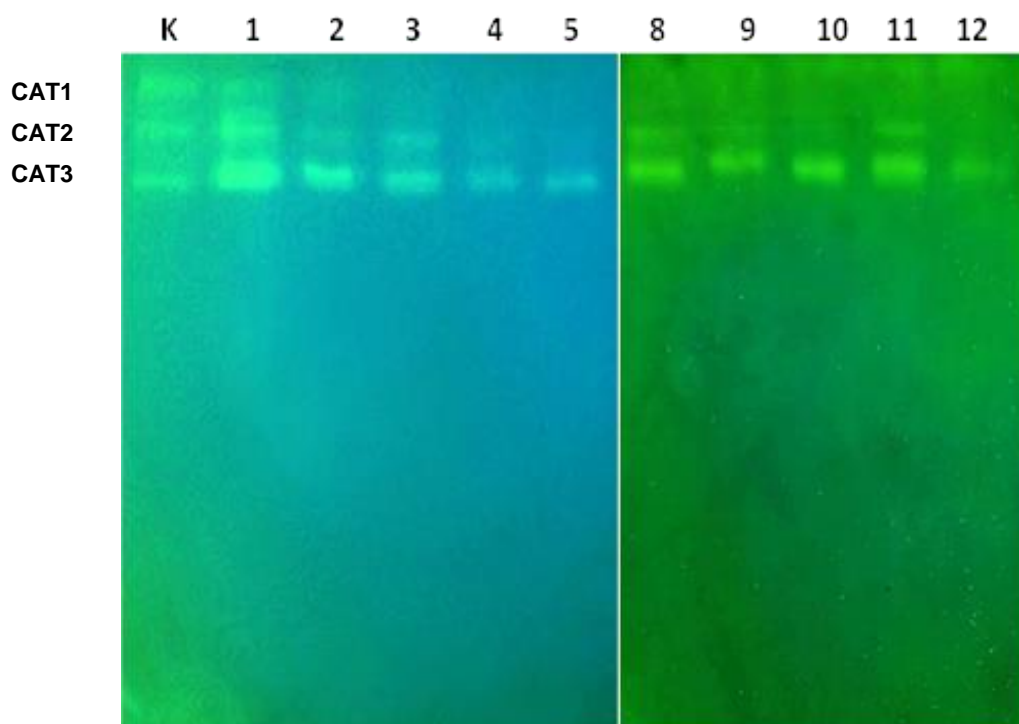
Aktivnost i izoforme enzima askorbat peroksidaze u listovima biljaka duhana prikazana je na slici 26. U analiziranim uzorcima detektirano je osam izoformi navedenog enzima, koje su prema rastućoj pokretljivosti u gelu označene kao APX1, APX2, APX3, APX4, APX5, APX6, APX7 i APX8. Izoforma APX1 imala je slabiji intenzitet u tretmanu s 25 µM AgNP u odnosu na kontrolu i druge tretmane, dok je vrpca APX2 bila jednakog intenziteta u svim tretmanima. Izoforme APX3 i APX4 pokazale su slabiju ekspresiju u tretmanu sa 50 µM AgNP, dok im je najjači intenzitet bio pri tretmanu sa 25 µM. Vrpce APX5, APX6 i APX7 pokazale su pojačanu ekspresiju u tretmanima s AgNO<sub>3</sub> u odnosu na AgNP i kontrolu. Vrpca APX8 imala je jednaki intenzitet u svim tretmanima.



Slika 26. Aktivnost i izoforme askorbat peroksidaze u gelu nakon native PAG elektroforeze u listovima biljaka duhana izloženih 7 dana tretmanima s AgNP i AgNO<sub>3</sub>. K - kontrola, 1 - 25 µM AgNP, 2 - 50 µM AgNP, 3 - 75 µM AgNP, 4 - 100 µM AgNP, 5 - 500 µM AgNP, 8 - 25 µM AgNO<sub>3</sub>, 9 - 50 µM AgNO<sub>3</sub>, 10 - 75 µM AgNO<sub>3</sub>, 11 - 100 µM AgNO<sub>3</sub>, 12 - 500 µM AgNO<sub>3</sub>.

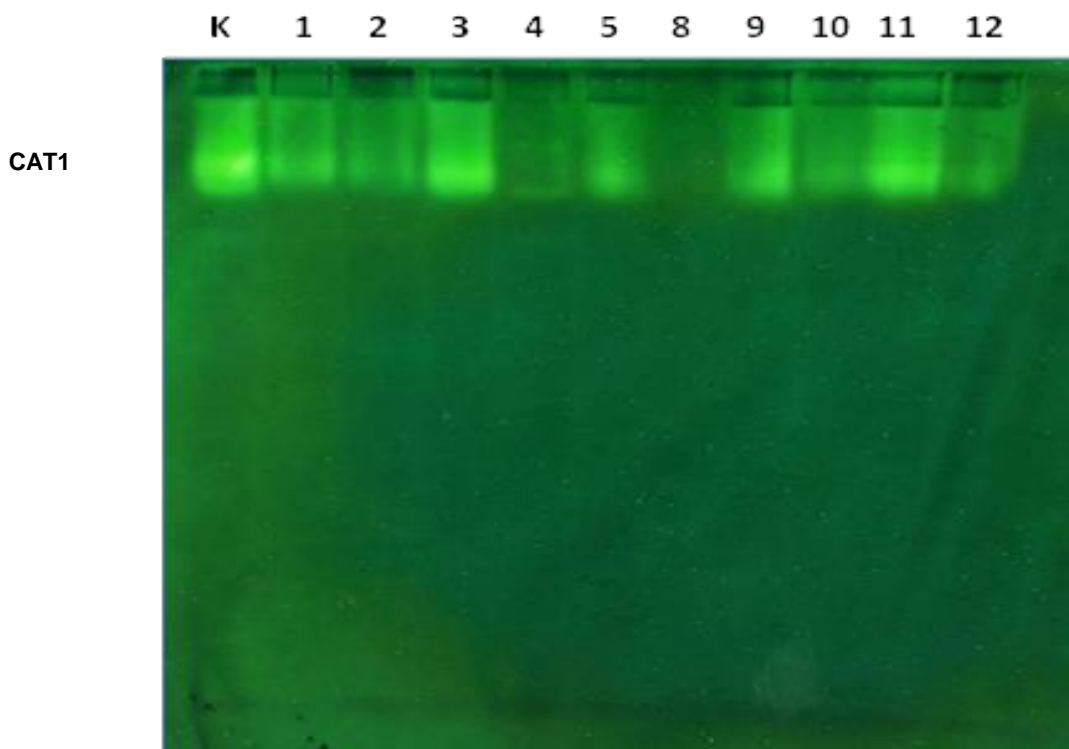
#### 4.6.4. Aktivnost katalaze

Na slici 27. prikazana je aktivnost i izoforme katalaze u korijenju biljaka duhana izloženih tretmanima s AgNP i AgNO<sub>3</sub>. Na gelu se mogu uočiti tri izoforme navedenog enzima, koje su prema rastućoj pokretljivosti u gelu označene kao: CAT1, CAT2 i CAT3. U tretmanima s AgNP porastom koncentracija vidljivo je slabio intenzitet izoformi CAT1 i CAT2 u odnosu na kontrolu. U tretmanima od 75 µM do 500 µM više nije vidljiva vrpca CAT1, dok se u 100 i 500 µM AgNP više ne uočava niti vrpca CAT2. Intenzitet CAT3 također slabi s porastom koncentracije AgNP, iako je pri 25 µM AgNP intenzitet vrpce bio jači u odnosu na kontrolu. U tretmanima s AgNO<sub>3</sub> izoforma CAT1 nije uočena, dok je CAT2 imala podjednaku ekspresiju kao u kontrolnom uzorku, s iznimkom tretmana od 500 µM AgNO<sub>3</sub> u kojem CAT2 nije detektirana. Vrpca CAT3 imala je najjaču ekspresiju koja je bila podjednaka onoj u kontrolnom uzorku, s iznimkom tretmana s 500 µM AgNO<sub>3</sub>.



Slika 27. Aktivnost i izoforme katalaze u gelu nakon native PAG elektroforeze u korijenju biljaka duhana izloženih 7 dana tretmanima s AgNP i AgNO<sub>3</sub>. K - kontrola, 1 - 25 µM AgNP, 2 - 50 µM AgNP, 3 - 75 µM AgNP, 4 - 100 µM AgNP, 5 - 500 µM AgNP, 8 - 25 µM AgNO<sub>3</sub>, 9 - 50 µM AgNO<sub>3</sub>, 10 - 75 µM AgNO<sub>3</sub>, 11 - 100 µM AgNO<sub>3</sub>, 12 - 500 µM AgNO<sub>3</sub>.

Na slici 28. prikazana je aktivnost katalaze u listovima biljaka duhana nakon izlaganja AgNP i AgNO<sub>3</sub>. Na gelu se može uočiti jedna izoforma navedenog enzima CAT1, koja je bila prisutna u kontroli i svim tretiranim listovima duhana, osim u 25 µM AgNO<sub>3</sub>. U većini tretmana izoforma CAT1 je bila slabije izražena nego u kontroli, a najslabija aktivnost je zabilježena nakon tretmana s 100 µM AgNP. Jedino su tretmani s 75 µM AgNP i 100 µM AgNO<sub>3</sub> pokazali podjednaku ekspresiju kao u kontroli.



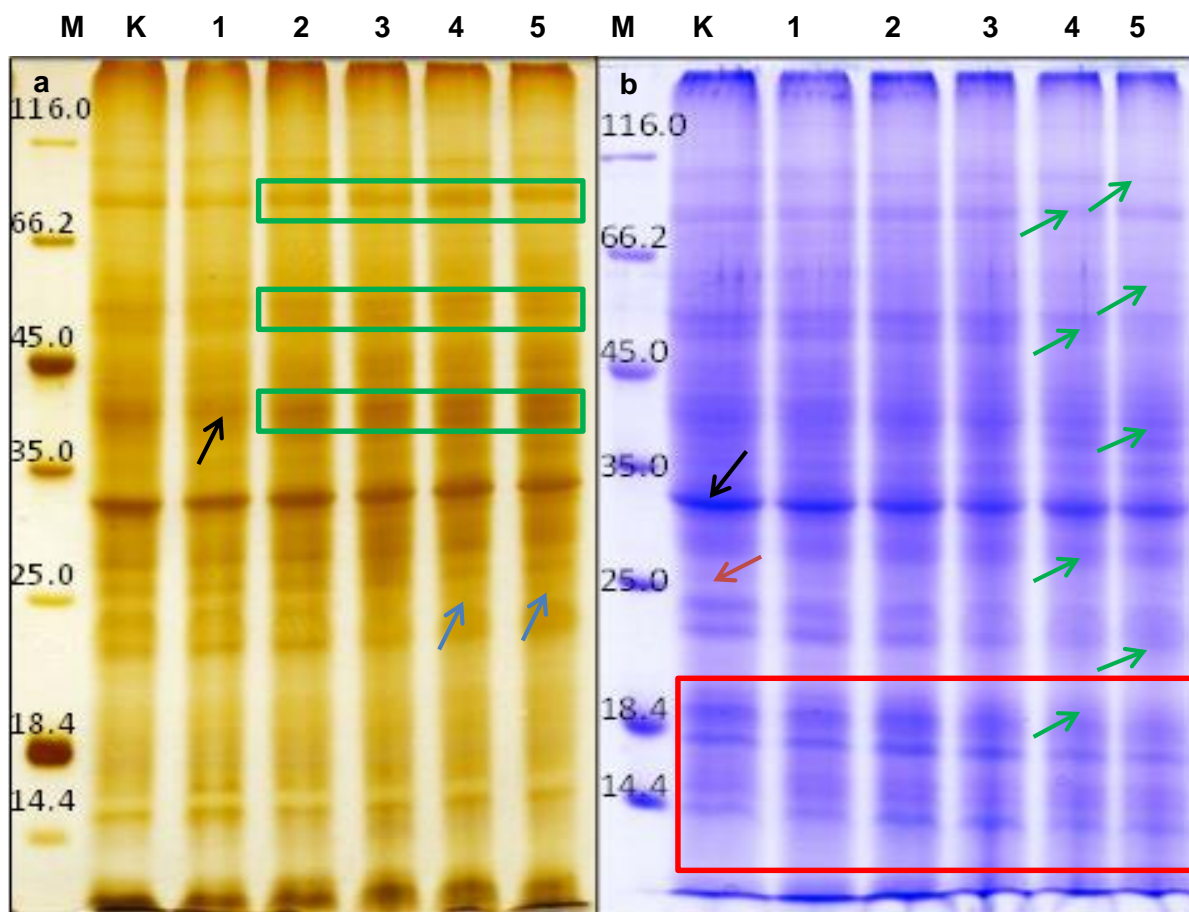
Slika 28. Aktivnost i izoforme katalaze u gelu nakon native PAG elektroforeze u listovima biljaka duhana izloženih 7 dana tretmanima s AgNP i AgNO<sub>3</sub>. K - kontrola, 1 - 25  $\mu$ M AgNP, 2 - 50  $\mu$ M AgNP, 3 - 75  $\mu$ M AgNP, 4 - 100  $\mu$ M AgNP, 5 - 500  $\mu$ M AgNP, 8 - 25  $\mu$ M AgNO<sub>3</sub>, 9 - 50  $\mu$ M AgNO<sub>3</sub>, 10 - 75  $\mu$ M AgNO<sub>3</sub>, 11 - 100  $\mu$ M AgNO<sub>3</sub>, 12 - 500  $\mu$ M AgNO<sub>3</sub>.

#### 4.7. Ekspresija ukupnih proteina

Na gelu bojanom srebrovim nitratom (Slika 29.a) moguće je uočiti nekoliko razlika u ekspresiji proteina u korijenju biljaka duhana izloženih djelovanju AgNP u odnosu na kontrolu. Nakon tretmana sa 100 i 500  $\mu$ M AgNP u korijenju je nedostajala vrpca proteina molekulske mase oko 22 kDa (stupac 4 i 5; plava strelica). Vrpce proteina molekulske mase od oko 40, 50 i 80 kDa imale su jaču ekspresiju u tretmanima sa 50, 75, 100 i 500  $\mu$ M AgNP u odnosu na kontrolu (zeleni pravokutnik), dok je protein molekulske mase od oko 40 kDa bio slabije izražen nakon izlaganja 25  $\mu$ M AgNP u odnosu na kontrolu i ostale tretmane (stupac 1; crna strelica).

Na gelu bojanom bojom CBB (Slika 29.b) uočila sam smanjenje intenziteta vrpce molekulske mase od oko 20, 22, 28, 35, 40, 47, 50, 70 i 90 kDa (stupac 4 i 5; zelene strelice). Iznimka je bio protein molekulske mase od 30 kDa koji je imao jednak intenzitet u svim tretmanima (crna strelica). Usporedbom gelova primjetila sam pojačanu ekspresiju većeg broja proteina molekulskih masa između 12 kDa i 20 kDa na gelu bojanom bojom CBB (crveni pravokutnik) u odnosu na gel bojan srebrovim

nitratom. S druge strane, na gelu obojanom srebrovim nitratom uočila sam ekspresiju proteina molekulske mase od 25 kDa, koji nije detektiran na gelu obojanom s bojom CBB (crvena strelica).



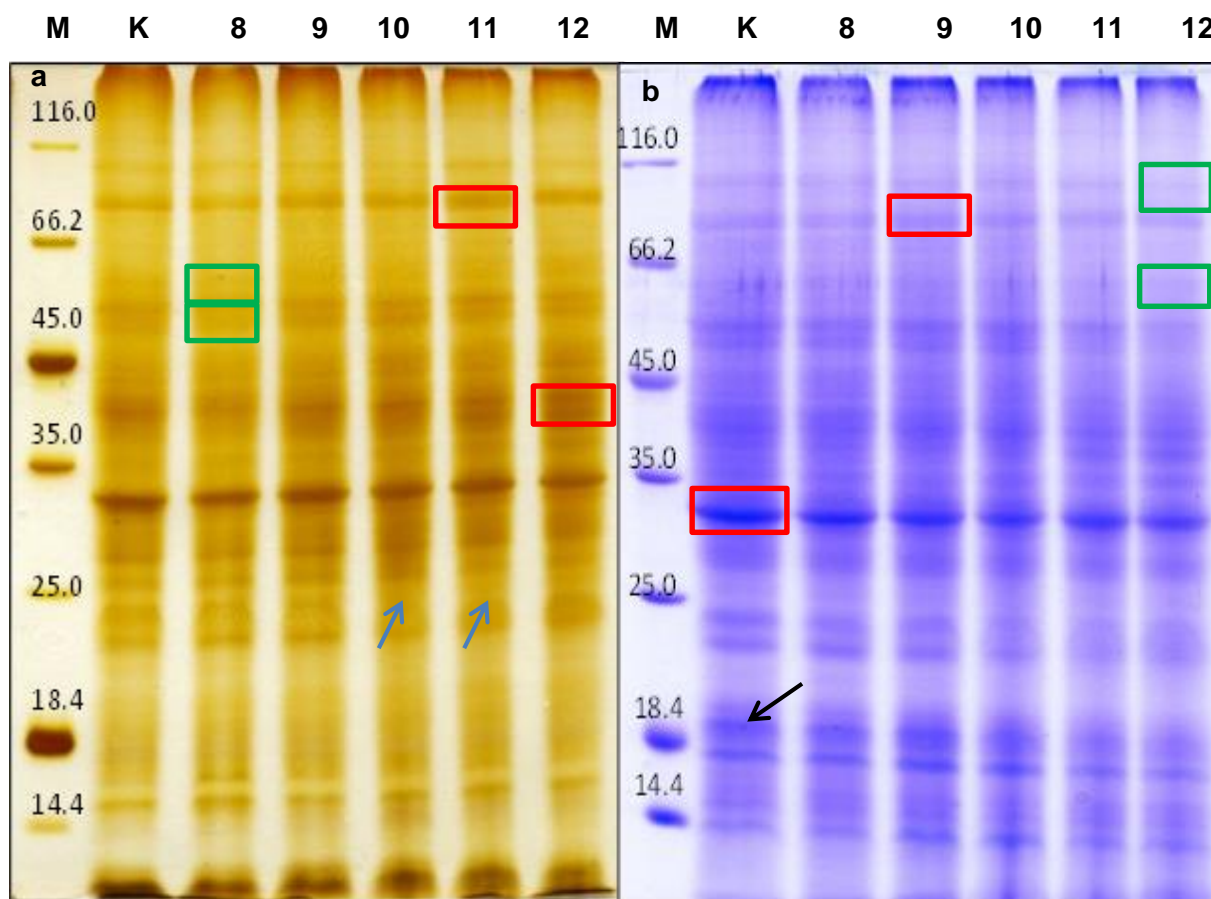
Slika 29. Ekspresija ukupnih topivih proteina u korijenu biljaka duhana izloženih 7 dana tretmanima s AgNP nakon SDS-PAG elektroforeze. Gelovi su obojani: a.) srebrovim nitratom i b.) bojom *Comassie Brilliant Blue*. M – biljezi molekularskih masa (kDa), K- kontrola, 1- 25 µM AgNP, 2 – 50 µM AgNP, 3 – 75 µM AgNP, 4 – 100 µM AgNP, 5 - 500 µM AgNP.

Na gelu obojanom srebrovim nitratom (Slika 30.a) uočava se nekoliko razlika u ekspresiji proteina u korijenu biljaka duhana izloženih  $\text{AgNO}_3$  u odnosu na kontrolu. Intenzitet proteina molekulske mase od oko 80 kDa pojačan je u tretmanu od 100 µM (stupac 1; crveni pravokutnik) u odnosu na ostale tretmane. Pojačan intenzitet imao je i protein mase 40 kDa u tretmanu s 500 µM  $\text{AgNO}_3$  (stupac 12; crveni pravokutnik). Nakon izlaganja biljke 25 µM  $\text{AgNO}_3$  bilo je vidljivo smanjenje ekspresije proteina molekulske mase od 47 i 50 kDa (stupac 8; zeleni pravokutnik) u odnosu na kontrolu.



Protein molekulske mase od 22 kDa nije detektiran u tretmanima sa 75 i 100  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  (stupac 10 i 11; plave strelice).

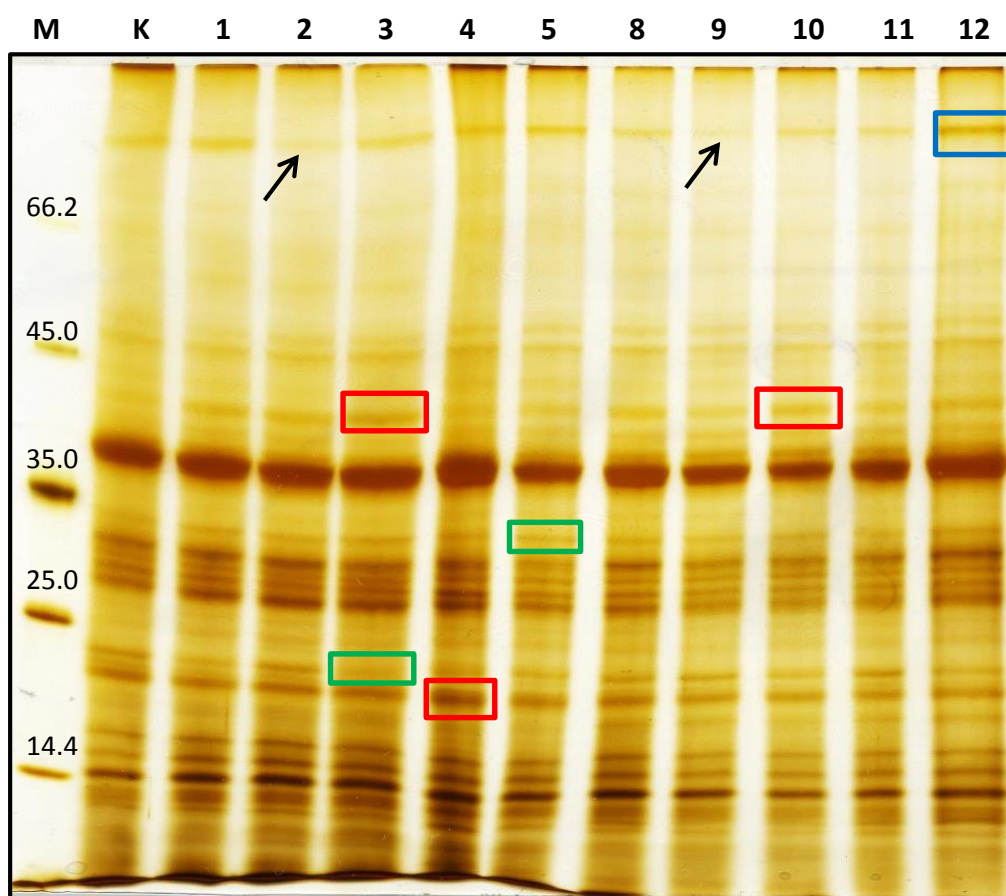
Na gelu bojanom bojom CBB (Slika 30.b) uočila sam nekoliko razlika u ekspresiji proteina u korijenju biljaka duhana izloženih  $\text{AgNO}_3$  u odnosu na kontrolu. Pojačanu ekspresiju pokazali su protein molekulske mase od 80 kDa pri tretmanu s 50  $\mu\text{M}$  (stupac 9; crveni pravokutnik) i protein molekulske mase od 32 kDa (kontrola; crveni pravokutnik). Proteini molekulske mase od 60 i 100 kDa pokazali su smanjenu ekspresiju nakon tretmana s 500  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  (stupac 12; zeleni pravokutnik). Usporedbom oba gela, u gelu obojanom bojom CBB uočava se protein molekulske mase od 19 kDa, koji nije vidljiv u gelu obojanom srebrovim nitratom (crne strelice).



Slika 30. Ekspresija ukupnih topivih proteina u korijenju biljaka duhana izloženih 7 dana tretmanima s  $\text{AgNO}_3$  nakon SDS-PAG elektroforeze. Gelovi su bojani a.) srebrovim nitratom i b.) bojom *Comassie Brilliant Blue*. M – biljezi molekulskih masa (kDa), K- kontrola, 8 - 25  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , 9 - 50  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , 10 - 75  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , 11 - 100  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , 12 - 500  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ .

Na gelu bojanom srebrovim nitratom (Slika 31.) moguće je uočiti nekoliko razlika u ekspresiji proteina u listovima biljaka izloženih djelovanju  $\text{AgNP}$  i  $\text{AgNO}_3$  u

odnosu na kontrolu. Nakon tretmana s 50  $\mu\text{M}$  AgNP i  $\text{AgNO}_3$  uočila sam smanjeni intenzitet proteina molekulske mase od oko 90 kDa (stupac 2, crna strelica; stupac 9, crna strelica). Protein molekulske mase od oko 90 kDa imao je pojačanu ekspresiju nakon tretmana s 500  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  (stupac 12; plavi pravokutnik). Protein molekulske mase od oko 40 kDa pokazao je pojačanu ekspresiju pri tretmanu sa 75  $\mu\text{M}$  AgNP i  $\text{AgNO}_3$  (stupac 3 i 10; crveni pravokutnici), kao i protein mase od oko 19 kDa nakon tretmana sa 100  $\mu\text{M}$  AgNP (stupac 4; crveni pravokutnik) u odnosu na kontrolu. Nakon izlaganja biljaka AgNP-u, na gelu bojanom srebrovim nitratom uočila sam smanjenu ekspresiju proteina molekulske mase od oko 32 kDa pri koncentraciji od 500  $\mu\text{M}$  (stupac 5; zeleni pravokutnik) i proteina od oko 20 kDa pri koncentraciji 75  $\mu\text{M}$  (stupac 3; zeleni pravokutnik).

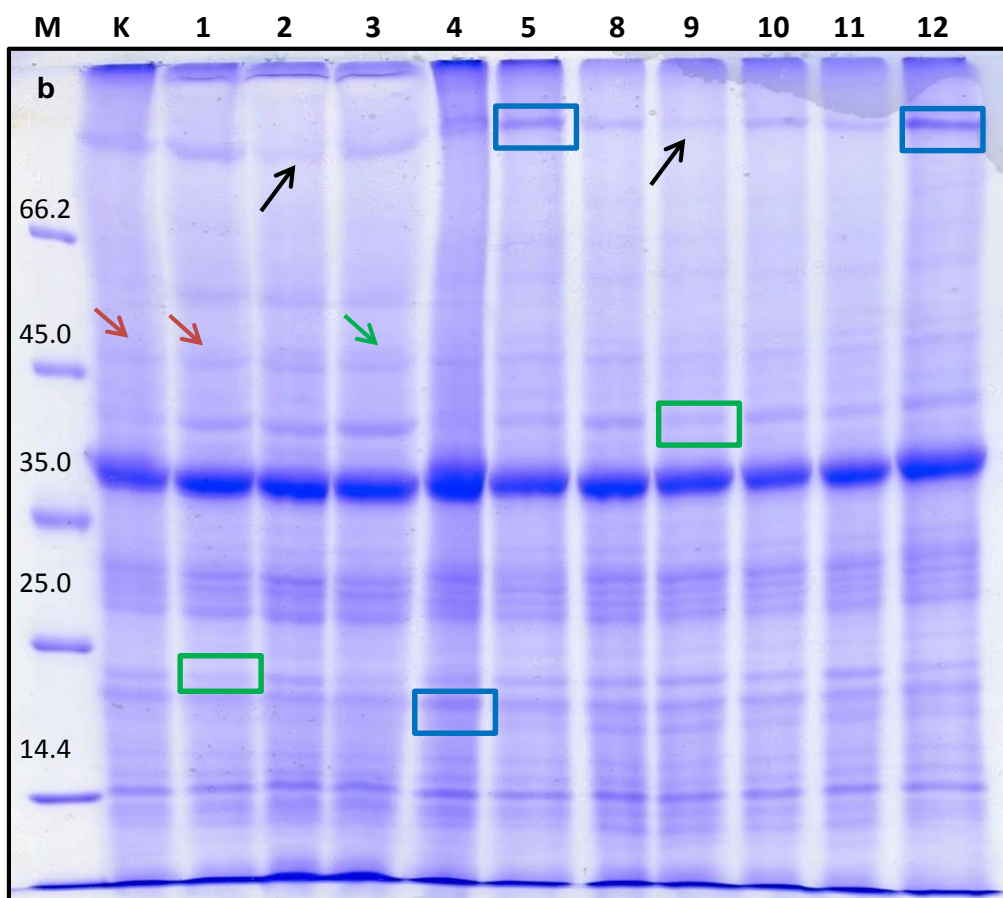


Slika 31. Ekspresija ukupnih topivih proteina u listovima biljaka duhana izloženih 7 dana tretmanima s AgNP i  $\text{AgNO}_3$  nakon SDS-PAGE elektroforeze. Gelovi su bojani srebrovim nitratom. M – biljezi molekulskih masa (kDa), M – biljezi molekulskih masa (kDa), 1 - 25  $\mu\text{M}$  AgNP, 2 - 50  $\mu\text{M}$  AgNP, 3 – 75  $\mu\text{M}$  AgNP, 4 - 100  $\mu\text{M}$  AgNP, 5 - 500  $\mu\text{M}$  AgNP, 8 - 25  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , 9 - 50  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , 10 - 75  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , 11 - 100  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , 12 - 500  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ .

Na gelu bojanom bojom CBB (Slika 32) vidljive su iste promjene za vrpce od 90 kDa (stupac 2 i 9, crna strelica; stupac 12, plavi pravokutnik), iako sam pri tretmanu od



500  $\mu\text{M}$  AgNP uočila pojačani intenzitet vrpce od 90 kDa koji nije bio vidljiv na gelu obojanim srebrovim nitratom. Proteinska vrpca molekulske mase od oko 50 kDa (stupac 4; zelena strelica) detektirana je u listovima nakon tretmana s 500  $\mu\text{M}$  AgNP i nakon svih tretmana s  $\text{AgNO}_3$ , a sam je uočila pri nižim koncentracijama AgNP ni u kontroli (kontrola i stupac 1; crvena strelica). Proteinska vrpca molekulske mase od 20 kDa pri tretmanu od 100  $\mu\text{M}$  s AgNP pokazala je pojačanu ekspresiju (stupac 4; plavi pravokutnik). Na gelu bojanom CBB vidljiv je smanjeni intenzitet vrpce molekulske mase od 22 kDa pri tretmanu od 25  $\mu\text{M}$  AgNP i 40 kDa pri tretmanu od 50  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  (stupac 1 i 9; zeleni pravokutnik).

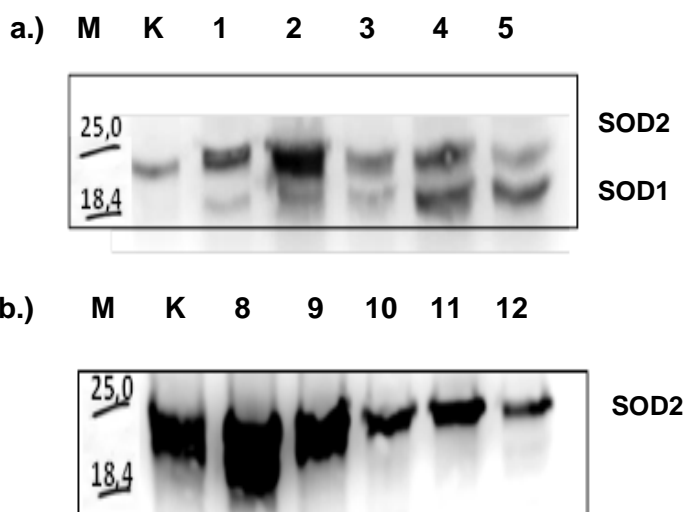


Slika 32. Ekspresija ukupnih topivih proteina u listovima biljaka duhana izloženih 7 dana tretmanima s AgNP i  $\text{AgNO}_3$  nakon SDS-PAG elektroforeze. Gelovi su bojani bojom *Comassie Brilliant Blue*. M – biljezi molekulskih masa (kDa), M – biljezi molekulskih masa (kDa), 1 - 25  $\mu\text{M}$  AgNP, 2 - 50  $\mu\text{M}$  AgNP, 3 – 75  $\mu\text{M}$  AgNP, 4 - 100  $\mu\text{M}$  AgNP, 5 - 500  $\mu\text{M}$  AgNP, 8 - 25  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , 9 - 50  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , 10 - 75  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , 11 - 100  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , 12 - 500  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ .

## 4.8. Imunodetekcija antioksidacijskih enzima

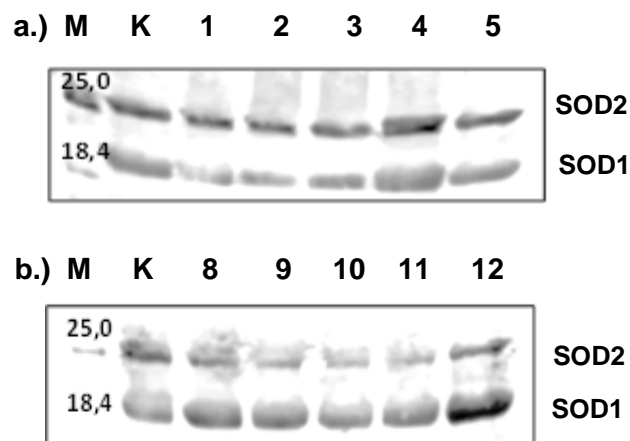
### 4.8.1. Superoksid dismutaza

Na membrani koja prikazuje ekspresiju superoksid dismutaze u korijenju biljaka duhana izloženih tretmanima s AgNP (Slika 33.a) vidljive su dvije vrpce i to od 19 kDa (SOD1) i 22 kDa (SOD2), s tim da vrpca SOD1 nije detektirana u kontrolnom uzorku. Pojačana ekspresija proteina SOD1 uočena je nakon tretmana s 100 i 500  $\mu\text{M}$  AgNP. Imunodetekcijskom analizom uzoraka izloženih djelovanju  $\text{AgNO}_3$  detektirana je samo izoforma SOD od 22 kDa (SOD2), koja je pokazala pojačanu ekspresiju nakon tretmana s 25  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  u odnosu na kontrolu i ostale tretmane (Slika 33b).



Slika 33. Imunodetekcija superoksid dismutaze u korijenju biljaka duhana izloženih 7 dana tretmanima s: a.) AgNP i b.)  $\text{AgNO}_3$ , M – biljezi molekulskih masa (kDa), K- kontrola, 1- 25  $\mu\text{M}$  AgNP, 2 – 50  $\mu\text{M}$  AgNP, 3 – 75  $\mu\text{M}$  AgNP, 4 – 100  $\mu\text{M}$  AgNP, 5 - 500  $\mu\text{M}$  AgNP, 8- 25  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , 9 - 50  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , 10 – 75  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , 11 – 100  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , 12 - 500  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ .

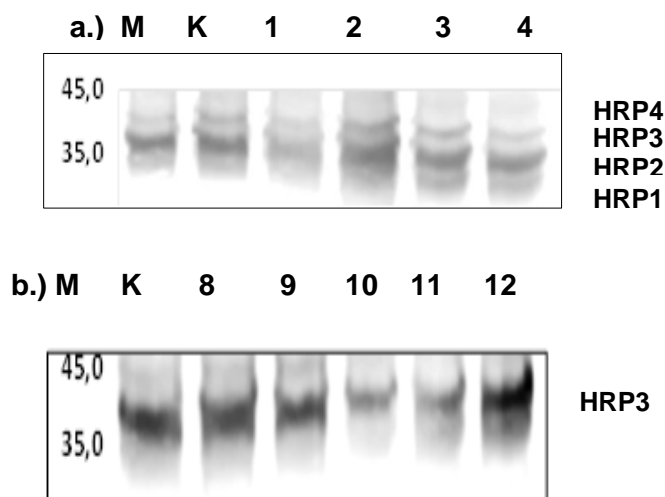
Na membranama koje prikazuju ekspresiju superoksid dismutaze u listovima biljaka duhana tretiranih sa AgNP i  $\text{AgNO}_3$  (Slika 34.a i b) vidljive su dvije vrpce ovog enzima i to od 19 kDa (SOD1) i 22 kDa (SOD2), a bile su prisutne u obje vrste tretmana. U listovima biljaka duhana izloženih AgNP SOD1 i SOD2 prisutne su u svim tretmanima; vrpca SOD1 bila je jače eksprimirana pri tretmanu sa 100  $\mu\text{M}$  AgNP u odnosu na kontrolu i druge tretmane (stupac 4), dok je vrpca SOD2 bila podjednake ekspresije u svim tretmanima (slika 34.a). Listovi biljaka duhana izloženi  $\text{AgNO}_3$  (Slika 34.b) nisu pokazali velike razlike u ekspresiji vrpce SOD1 i SOD2 u usporedbi niti s kontrolom niti međusobno; jedina iznimka je 500  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  pri kojem je intenzitet vrpce SOD1 bio veći nego u kontroli i ostalim tretmanima s  $\text{AgNO}_3$  (stupac 5).



Slika 34. Imunodetekcija superoksid dismutaze u listovima biljaka duhana izloženih 7 dana tretmanima s: a.) AgNP i b.) AgNO<sub>3</sub>, M – biljezi molekulskih masa (kDa), K- kontrola, 1 - 25 µM AgNP, 2 - 50 µM AgNP, 3 – 75 µM AgNP, 4 - 100 µM AgNP, 5 - 500 µM AgNP, 8 - 25 µM AgNO<sub>3</sub>, 9 - 50 µM AgNO<sub>3</sub>, 10 - 75 µM AgNO<sub>3</sub>, 11 - 100 µM AgNO<sub>3</sub>, 12 - 500 µM AgNO<sub>3</sub>.

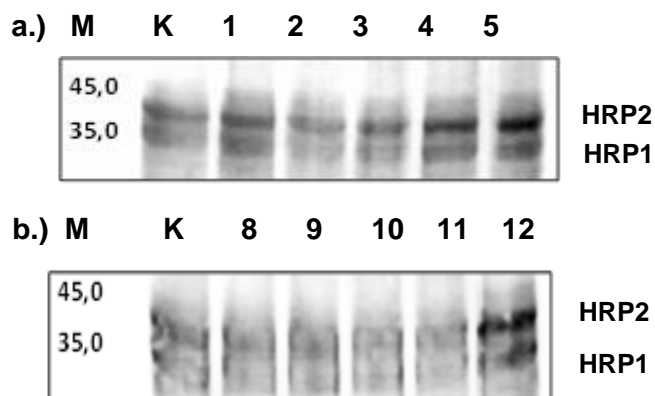
#### 4.8.2. Peroksidaza iz hrena

Na slici 35. prikazana je ekspresija proteina HRP u korijenju biljaka duhana tretiranih sa AgNP i AgNO<sub>3</sub>. Ukupno su detektirane četiri proteinske vrpce molekulskih masa od 30 kDa (HRP1), 35 kDa (HRP2), 38 kDa (HRP3) i 45 kDa (HRP4). U korijenju biljaka duhana izloženih AgNP u svim tretmanima bila je prisutna vrpca HRP2; najjaču ekspresiju pokazala je vrpca HRP3 u svim tretmanima, osim pri koncentraciji od 50 µM (stupac 2) gdje je bila slabijeg intenziteta (Slika 35.a). Sve četiri vrpce bile su prisutne pri višim koncentracijama AgNP, a njihova ekspresija bila je najjača izražena u tretmanu sa 75 µM AgNP (stupac 3). U korijenima biljaka duhana koji su bili na tretmanu s AgNO<sub>3</sub> vidljiva je bila samo vrpca HRP3, pri svim ispitanim koncentracijama (Slika 35.b).



Slika 35. Imunodetektacija peroksidaze HRP u korijenju biljaka duhana izloženih 7 dana tretmanima s: a.) AgNP i b.) AgNO<sub>3</sub>, M – biljezi molekulskih masa (kDa), K - kontrola, 1 - 25 µM AgNP, 2 - 50 µM AgNP, 3 - 75 µM AgNP, 4 – 100 µM AgNP, 5 - 500 µM AgNP, 8 - 25 µM AgNO<sub>3</sub>, 9 - 50 µM AgNO<sub>3</sub>, 10 - 75 µM AgNO<sub>3</sub>, 11 - 100 µM AgNO<sub>3</sub>, 12 - 500 µM AgNO<sub>3</sub>.

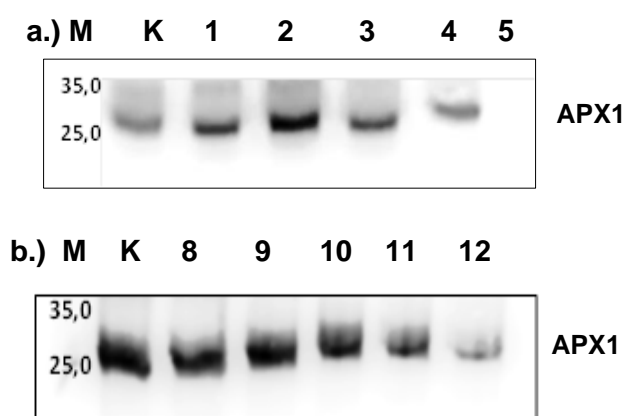
Na slici 36. prikazana je ekspresija proteina HRP u listovima biljaka duhana tretiranih AgNP i AgNO<sub>3</sub>. Ukupno su detektirane dvije vrpce molekulskih masa od 35 kDa (HRP1) i 40 kDa (HRP2). Vrpce HRP1 i 2 pokazale su slabiju ekspresiju nakon tretmana s 50 i 75 µM AgNP u odnosu na kontrolu i druge tretmane, dok je vrpca HRP2 bila jače eksprimirana u korijenju nakon izlaganja tretmanima s 100 i 500 µM AgNP (Slika 36.a). U listovima biljaka duhana tretiranim s AgNO<sub>3</sub> također su detektirane vrpce HRP1 i HRP2. Vrpca HRP1 bila je jasno eksprimirana u kontroli, a znatno slabije nakon tretmana, s iznimkom 500 µM AgNO<sub>3</sub>. Protein HRP2 pokazao je najjaču ekspresiju u tretmanu od 500 µM AgNO<sub>3</sub>, dok je u ostalim tretmanima bio podjednake ekspresije kao u kontroli (Slika 36.b).



Slika 36. Imunodetektacija peroksidaze HRP u listovima biljaka duhana izloženih 7 dana tretmanima s: a.) AgNP i b.) AgNO<sub>3</sub>, M – biljezi molekulske mase (kDa), K- kontrola, 1- 25 µM AgNP, 2 – 50 µM AgNP, 3 – 75 µM AgNP, 4 – 100 µM AgNP, 5 - 500 µM AgNP, 8- 25 µM AgNO<sub>3</sub>, 9 - 50 µM AgNO<sub>3</sub>, 10 – 75 µM AgNO<sub>3</sub>, 11 – 100 µM AgNO<sub>3</sub>, 12 - 500 µM AgNO<sub>3</sub>.

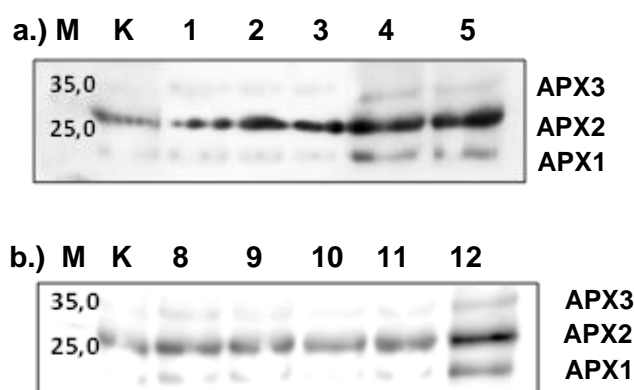
#### 4.8.3. Askorbat peroksidaza

Na slici 37. prikazana je ekspresija proteina APX u korijenu biljaka duhana tretiranih sa AgNP i AgNO<sub>3</sub>. Uočena je samo jedna vrpca molekulske mase od 30 kDa (APX1), koja je nedostajala u tretmanu s najvećom koncentracijom AgNP (stupac 5), dok je najjači intenzitet imala pri koncentraciji od 50 µM AgNP (uzorak 2), u odnosu na kontrolu i ostale tretmane (slika 37.a). U korijenu biljaka duhana tretiranih s AgNO<sub>3</sub> također je detektirana samo vrpca od 30 kDa (APX1); najjači intenzitet pokazala je u kontrolnom uzorku, dok je intenzitet slabio s povećanjem koncentracije AgNO<sub>3</sub> (Slika 37.b).



Slika 37. Imunodetektacija askorbat peroksidaze u korijenu biljaka duhana izloženih 7 dana tretmanima s: a.) AgNP i b.) AgNO<sub>3</sub>, M – biljezi molekulske mase (kDa), K- kontrola, 1- 25 µM AgNP, 2 – 50 µM AgNP, 3 – 75 µM AgNP, 4 – 100 µM AgNP, 5 - 500 µM AgNP, 8- 25 µM AgNO<sub>3</sub>, 9 - 50 µM AgNO<sub>3</sub>, 10 – 75 µM AgNO<sub>3</sub>, 11 – 100 µM AgNO<sub>3</sub>, 12 - 500 µM AgNO<sub>3</sub>.

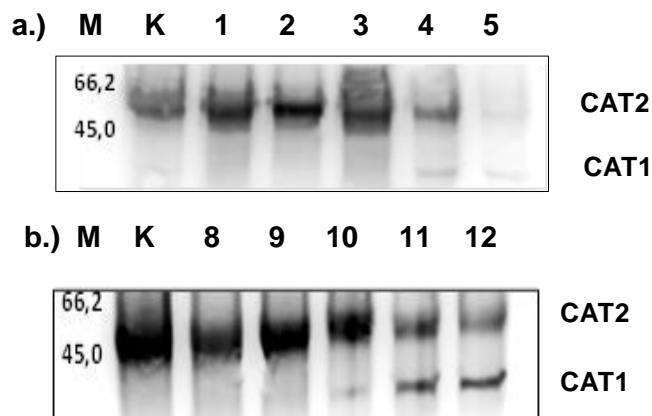
Na slici 38. prikazana je ekspresija proteina APX u listovima biljaka duhana tretiranih sa AgNP i AgNO<sub>3</sub>. Uočene su tri vrpce molekulskih masa od 25 kDa (APX1), 30 kDa (APX2) i 35 kDa (APX3). U listu biljaka duhana izloženih AgNP najjači intenzitet u svim tretmanima pokazala je vrpca APX2, koja je bila prisutna u kontroli i svim tretmanima. Proteini APX1 i APX3 bili su jasno vidljivi samo u tretmanima sa 100 i 500 µM AgNP, dok su u ostalim tretmanima bili prisutni kao vrlo blijede vrpce (Slika 38.a). U listu biljke duhana tretirane s AgNO<sub>3</sub> detektirane su iste tri proteinske vrpce APX1, APX2 i APX3. Najjači intenzitet ponovo je imala vrpca APX2 i ona je jedina bila prisutna u kontroli i svim tretmanima. Vrpce APX1 i APX3 jasno su vidljive samo pri koncentraciji od 500 µM AgNO<sub>3</sub> (Slika 38.b).



Slika 38. Imunodetekcija askorbat peroksidaze u listovima biljaka duhana izloženih 7 dana tretmanima s: a.) AgNP i b.) AgNO<sub>3</sub>, M – biljezi molekulskih masa (kDa), K- kontrola, 1- 25 µM AgNP, 2 – 50 µM AgNP, 3 – 75 µM AgNP, 4 – 100 µM AgNP, 5 - 500 µM AgNP, 8- 25 µM AgNO<sub>3</sub>, 9 - 50 µM AgNO<sub>3</sub>, 10 – 75 µM AgNO<sub>3</sub>, 11 – 100 µM AgNO<sub>3</sub>, 12 - 500 µM AgNO<sub>3</sub>.

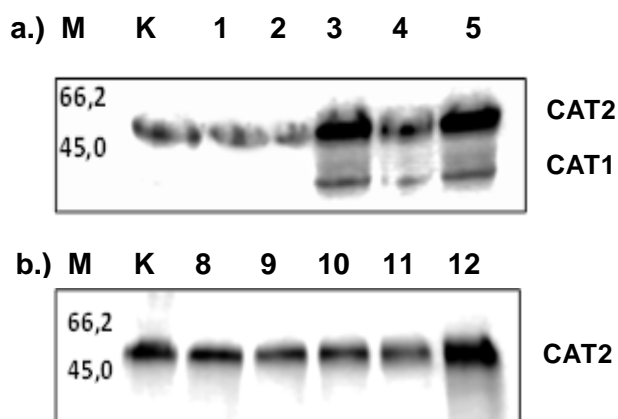
#### 4.8.4. Katalaza

Na slici 39. prikazana je ekspresija proteina CAT u korijenju biljaka duhana tretiranih sa AgNP i AgNO<sub>3</sub>. Uočene su dvije vrpce molekulske mase oko 40 kDa (CAT1) i 60 kDa (CAT2). U korijenu biljke duhana tretirane s AgNP vrpca CAT2 imala je jači intenzitet u kontroli i svim tretmanima u odnosu na protein CAT1. Iznimka je bio tretman s 500 µM AgNP gdje su obje vrpce bile slabo vidljive. Protein CAT2 bio je eksprimiran kao vrlo blijeda vrpca nakon izlaganja duhana tretmanu sa 100 µM i 500 µM AgNP (Slika 39.a). U korijenu biljke duhana tretirane s AgNO<sub>3</sub> također su bile vidljive iste dvije vrpce CAT 1 i CAT2. Ekspresija proteina CAT2 bila je jača od proteina CAT1 u kontroli i svim tretmanima. Izoforma CAT2 ponovno je bila prisutna samo nakon tretmana s najvećim ispitanim koncentracijama AgNO<sub>3</sub> (100 i 500 µM) (Slika 39.b), ali je intenzitet bio jači nego u tretmanima s AgNP.



Slika 39. Imunodetektorske slike katalaze u korijenju biljaka duhana izloženih 7 dana tretmanima s: a.) AgNP i b.) AgNO<sub>3</sub>, M – biljezi molekulskih masa (kDa), K- kontrola, 1- 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 - 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 - 500 μM AgNP, 8- 25 μM AgNO<sub>3</sub>, 9 - 50 μM AgNO<sub>3</sub>, 10 - 75 μM AgNO<sub>3</sub>, 11 – 100 μM AgNO<sub>3</sub>, 12 - 500 μM AgNO<sub>3</sub>.

Na slici 40. prikazana je ekspresija katalaze u listovima biljaka duhana tretiranih s AgNP i AgNO<sub>3</sub>. U listovima biljaka tretiranih s AgNP uočene su dvije vrpce molekulskih masa od 45 kDa (CAT1) i 60 kDa (CAT2). Vrpca CAT1 bila je eksprimirana samo u tretmanima s 75, 100 i 500 μM AgNP, dok je protein CAT1 bio prisutan u kontroli i svim tretmanima, iako je pri višim koncentracijama AgNP imao jaču ekspresiju (Slika 40.a). Nakon tretmana s AgNO<sub>3</sub> uočila sam samo prisutnost vrpce molekulske mase od 45 kDa (CAT2), koja je bila jače eksprimirana u tretmanu s 500 μM AgNO<sub>3</sub> u odnosu na kontrolu i ostale tretmane (Slika 40.b).



Slika 40. Imunodetektorske slike katalaze u listovima biljaka duhana izloženih 7 dana tretmanima s: a.) AgNP i b.) AgNO<sub>3</sub>, M – biljezi molekulskih masa (kDa), K- kontrola, 1- 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 - 500 μM AgNP, 8- 25 μM AgNO<sub>3</sub>, 9 – 50 μM AgNO<sub>3</sub>, 10 – 75 μM AgNO<sub>3</sub>, 11 – 100 μM AgNO<sub>3</sub>, 12 - 500 μM AgNO<sub>3</sub>.

**RASPRAVA**



## 5. RASPRAVA

Danas se nanotehnologija brzo razvija i njezin razvoj otvara mnogo nerazjašnjenih pitanja, među kojima je najvažnije: „Kakve rizike sa sobom nosi sve češća upotreba nanočestica na okoliš i žive organizme?“ (Nowack i sur., 2007). Jedna od najčešće korištenih vrsta nanočestica su nanočestice srebra (AgNP), koje imaju vrlo široku primjenu (Tran i sur., 2013; Choi i sur., 2008). Utjecaj AgNP na okoliš i žive organizme ispitan je u brojnim istraživanjima, većina kojih je provedeno na bakterijama, gljivama, beskralježnjacima i kralježnjacima (Levard i sur., 2012; Seltenrich, 2013), a manjim dijelom na biljkama. No, u posljednjih nekoliko godina provode se mnogi eksperimenti koji su se fokusirali na toksičnost nanosrebra na biljke (Yin i sur., 2011; Whang i sur., 2011; Kumari i sur., 2009; Stampoulis i sur., 2009; Geisler-Lee i sur., 2014).

Istraživanja u svom diplomskom radu odlučila sam provesti na biljkama duhana (*Nicotiana tabacum* L.). kako bih ispitala moguću toksičnost nanočestica srebra (AgNP) i usporedila je s toksičnim učinkom ionskog srebra (AgNO<sub>3</sub>), jer je iz prethodno objavljenih rezultata poznato da se ioni srebra mogu otpustiti sa nanočestica i na taj način izazvati toksične učinke (Yin i sur., 2011; Qian i sur., 2013).

Budući da su neka istraživanja pokazala da metali mogu izazvati povećano stvaranje ROS-a i oksidacijski stres u biljnim organizmima (Hsin i sur., 2008; Balen i sur., 2011; Tkalec i sur., 2014) prvi parametar koji sam ispitala u svom diplomskom radu bio je učinak AgNP i AgNO<sub>3</sub> na pojavu ROS-a u korijenu i listovima biljaka duhana. Naime, kada su u stanici oksidansi i antioksidansi u ravnoteži, ROS imaju ulogu signalnih molekula, no ako je ta ravnoteža narušena, ROS izaziva pojavu oksidacijskog stresa (Inze i Montagu, 2003; Mittler i sur., 2004). Neka do sada provedena istraživanja pokazala su kako i AgNP i AgNO<sub>3</sub> mogu izazvati oksidacijski stres u stanicama biljaka (Nair i Chung, 2014a; Barbasz i sur., 2016; Jiang i sur., 2014). Istraživanje koje sam provela na biljkama duhana pokazalo je povećanu razinu stvaranja ROS-a samo u korijenu pri tretmanima sa 100 i 500 µM AgNO<sub>3</sub>, dok u tretmanima sa AgNP nije bilo promjena u odnosu na kontrolu. Istraživanje na korijenu luka (*Allium cepa*) sa istim tipom AgNP čestica sa citratnim omotačem koje sam ja koristila u ovom radu, pokazalo je povećanje razine ROS-a nakon tretmana s 50, 75 i 100 µM AgNP, dok je izlaganje ionskom srebru rezultiralo povećanim stvaranjem ROS-a već nakon tretmana s koncentracijom od 25 µM (Cvjetko i sur., 2017). Ovi rezultati upućuju na različitu osjetljivost različitih biljnih vrsta na nanočestice srebra i ionsko srebro te pokazuju da srebro u oba oblika može izazvati pojavu oksidacijskog stresa, koji onda može rezultirati različitim poremećajem u funkciji stanice. Nadalje, rezultati mog istraživanja pokazuju veću toksičnost

ionskog srebra na biljne organizme u odnosu na nanosrebro, što je u skladu s prethodno objavljenim istraživanjima (Nair i Chung, 2014a; Nair i Chung, 2014b; Cvjetko i sur., 2017).

Pojavom oksidacijskog stresa u organizmu nastaju slobodni radikali koji napadaju stanične membrane izgrađene od višestruko nezasićenih masnih kiselina, što uzrokuje lipidnu peroksidaciju (Labbuda, 2013). Napadima slobodnih radikala oštećuje se stanična membrana i time postaje lakše propusna za tvari koje prije nisu mogle ući u stanicu (Anjum i sur., 2013). U istraživanju koje sam provela razina MDA nije bila povišena u korijenu i listu biljaka duhana nakon tretmana s AgNP. To je u skladu sa niskom razinom ROS-a koja je dobivena nakon tretmana s AgNP-om, ali je u suprotnosti sa rezultatima dobivenim u istraživanjima utjecaja AgNP na pšenicu (Barbasz i sur., 2016), *Arabidopsis* (Nair i Chung, 2014a) i rižu (Nair i Chung, 2014b), gdje je zabilježena povišena razina MDA. S druge strane, u korijenju biljaka duhana tretiranih s AgNO<sub>3</sub> zabilježila sam porast razine MDA u većini tretmana u odnosu na kontrolu, dok je u listovima povećani sadržaj MDA zabilježen pri najvišim ispitivanim koncentracijama (100 i 500 µM AgNO<sub>3</sub>). Dobiveni rezultati su u skladu sa radovima koje su objavili Nair i Chung (2014b) i Cvjetko i sur. (2017).

Osim ROS-a i MDA, pokazatelj oksidacijskog stresa u biljci je i sadržaj proteinskih karbonila koji nastaje oksidacijom proteina u stanici (Gill i Tutej, 2010). U provedenom istraživanju sadržaj proteinskih karbonila nije pokazao statistički značajne promjene u odnosu na kontrolu nakon tretmana s AgNP-om, ni u korijenu ni u listovima, što je u skladu sa niskom razinom ROS-a u ovim tretmanima. No, ovi rezultati u suprotnosti su sa rezultatima dobivenim u pšenici (Barbasz i sur., 2016), *Arabidopsisu* (Nair i Chung, 2014a) i riži (Nair i Chung, 2014b), koji su tretirani s AgNP, a gdje je zabilježen povišeni sadržaj proteinskih karbonila. U korijenju i listovima biljaka izloženih djelovanju AgNO<sub>3</sub> zabilježila sam porast sadržaja proteinskih karbonila, koji je značajno narastao pri svim ispitivanim koncentracijama u korijenju i gotovo svim koncentracijama u listovima, što je u skladu s ranije objavljenim rezultatima (Nair i Chung, 2014b; Cvjetko i sur., 2017).

U svom istraživanju pomoću Comet testa utvrdila sam stupanj oštećenja molekule DNA mjerenjem postotka DNA u repu. Rezultati istraživanja su pokazali da tretmani s AgNP nisu izazvali pojačano oštećenje molekule DNA, što je ponovno u skladu sa dobivenim rezultatima sadržaja ROS-a. Vannini i sur. (2014) nisu zabilježili pojačano oštećenje molekule DNA u sadnicama pšenice nakon izlaganja nanočesticama srebra, a oštećenje molekule DNA nije pronađeno ni u korijenu luka nakon tretmana s AgNP (Cvjetko i sur., 2017). S druge strane, korijenje biljaka duhana izloženih tretmanima s AgNO<sub>3</sub> pokazalo je statistički značajno oštećenje molekule DNA u odnosu na kontrolu, što je u skladu s

povećanom razinom ROS-a izmjerenom u ovim tretmanima, a slične rezultate dobili su i Nair i Chung (2014b) te Cvjetko i sur. (2017) u svojim istraživanjima.

Ako se usporede rezultati parametara oksidacijskog stresa dobiveni u korijenju i listovima, može se zaključiti da su učinci zabilježeni u listovima puno manji nego u korijenju. Naime tretmani s AgNP-om nisu inducirali promjenu u sadržaju ROS-a, MDA i proteinskih karbonila, kao ni u povišenju postotka DNA u repu u listovima duhana. Jedino značajno povišenje MDA zabilježeno je u tretmanu s AgNP pri koncentraciji od 500  $\mu\text{M}$ . Što se tiče tretmana s  $\text{AgNO}_3$ , najjači učinak zabilježen je u sadržaju proteinskih karbonila, koji je bio značajan u gotovo svim tretmanima. No, unatoč povećanju sadržaja proteinskih karbonila u listovima, vrijednosti dobivene u korijenu bile su dvostruko veće za odgovarajuće koncentracije. Ovakav rezultat mogao bi biti posljedica smanjene akumulacije srebra u listovima u odnosu na korijen biljke. To bi značilo da je većina apsorbiranog srebra ostala u stanicama korijena, dok se samo mali dio transportirao do stanica lista. Povećana akumulacija srebra u korijenju u usporedbi s listovima već je zabilježena u radovima drugih autora (Shtangeeva i sur., 2011; Geisler-Lee i sur., 2014).

Rezultati parametara oksidacijskog stresa ispitani u ovom istraživanju pokazuju pojavu oksidacijskog stresa nakon izlaganja biljaka nanosrebru, ali u usporedbi s rezultatima drugih istraživanja sugeriraju da osjetljivost na AgNP ovisi o vrsti biljke. Nadalje, uzevši u obzir razlike u rezultatima mjerenih parametara nakon izlaganja biljaka duhana istim koncentracijama  $\text{AgNO}_3$  i AgNP, možemo zaključiti da nakon ulaska u biljnu stanicu AgNP ostaje u obliku nanočestica, što sugerira da su AgNP visoko stabilne te da ne otpuštaju ionsko srebro ili ga otpuštaju u vrlo malim količinama, te stoga tretmani s AgNP pokazuju manju toksičnost u odnosu na  $\text{AgNO}_3$ .

Kako bi se biljke uspješno obranile od stresa stvorile su različite učinkovite mehanizme za obranu, a jedan od njih su antioksidacijski enzimi (Mittler, 2002). Jedan od prvih antioksidacijskih enzima u obrani biljaka je superoksid dismutaza (SOD), koja prevodi superoksidni radikal do molekularnog kisika i vodikovog peroksida (Arora i sur., 2002). U korijenju duhana nakon tretmana s AgNP nisu zabilježene značajne promjene u aktivnosti SOD, iako su nakon tretmana pri koncentracijama od 100 i 500  $\mu\text{M}$  zabilježene niže vrijednosti u odnosu na kontrolu. Nakon tretmana s  $\text{AgNO}_3$ , aktivnost SOD se povećala pri koncentracijama od 25 i 50  $\mu\text{M}$ , nakon čega je zabilježen pad vrijednosti koji nije znatno manji u odnosu na kontrolu. Ipak, aktivnost SOD u gelu pokazala je pojačanu izoformu ovog enzima jednakog intenziteta pri svim ispitivanim koncentracijama AgNP i  $\text{AgNO}_3$ , dok je imunodetekcija s protutijelom anti-SOD pokazala dvije vrpce nakon tretmana s AgNP. Vrpce su imale pojačanu ekspresiju pri koncentracijama od 100 i 500  $\mu\text{M}$ , a u tretmanu s  $\text{AgNO}_3$

detektirana je samo jedna izoforma koja pokazuje pojačanu ekspresiju pri koncentraciji od 25  $\mu\text{M}$ . Ovi rezultati su u dobroj korelaciji sa sadržajem ROS-a mjenjenog u korijenu nakon oba tipa tretmana jer DHE test koji se primjenjuje za detekciju ROS-a uglavnom mjeri formiranje  $\text{O}_2^-$  (Domijan i Abramov, 2011), koji biva neutraliziran od strane SOD-a. Kako u biljkama tretiranim s AgNP nije došlo do povećanog stvaranja ROS-a, nisu zabilježene ni značajne promjene u aktivnosti SOD. Značajne razlike u aktivnosti SOD nije pokazao ni kalus ječma nakon izlaganja nanočesticama srebra (Barbasz i sur., 2016), što je u skladu s mojim rezultatima. S druge strane, u tretmanima s  $\text{AgNO}_3$  primijetila sam povećanu aktivnost SOD pri nižim koncentracijama (25, 50 i 75  $\mu\text{M}$ ), što je stvaranje ROS-a zadržalo na kontrolnim vrijednostima. Pri višim koncentracijama  $\text{AgNO}_3$  zabilježila sam značajan pad aktivnosti SOD-a, što ukazuje na vrlo jaki oksidacijski stres koji suprimira aktivnost enzima te sukladno tome rezultira povećanim stvaranjem ROS-a. Slična opažanja u aktivnosti SOD zabilježena su u istraživanjima na biljci *Arabidopsis*, izloženoj blagim i jakim stresnim uvjetima (Alscher i sur., 2002).

S druge strane, u listovima duhana nakon tretmana s AgNP i  $\text{AgNO}_3$  nisam zabilježila značajne promjene u aktivnosti SOD, što je u korelaciji sa sadržajem ROS-a izmjenjenog u listovima. Ipak, aktivnost SOD u gelu pokazala je izoformu ovog enzima jednakog intenziteta pri svim ispitivanim koncentracijama AgNP i  $\text{AgNO}_3$ , dok je imunodetekcija protutijelom anti-SOD pokazala dvije vrpce (SOD1 i SOD2) prisutne u obje vrste tretmana koje nisu pokazivale velike razlike u ekspresiji. Pojačana ekspresija zabilježena je za vrpce SOD1 nakon tretmana s 100  $\mu\text{M}$  AgNP i 500  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ . Ovi rezultati potvrđuju da je učinak ispitanih tretmana bio slabiji u listovima izloženih biljaka duhana u odnosu na korijen.

Aktivacijom antioksidacijskog enzima SOD i stvaranjem superoksidnih radikala u obranu stanica uključuju se i drugi antioksidacijski enzimi. Enzimi katalaza, peroksidaza i askorbat peroksidaza uklanjaju produkte pretvorbe superoksidnog radikala, odnosno prevode vodikov peroksid do molekularnog kisika i vode (Ahmad i sur., 2010).

Aktivnost PPX nije pokazala statistički značajnu promjenu niti u jednoj od ispitanih koncentracija AgNP u korijenu, dok je u biljaka izloženih tretmanima  $\text{AgNO}_3$  zabilježeno povećanje u svim tretmanima. Ovi rezultati su u korelaciji s ranijim istraživanjima na pšenici (Barbasz i sur., 2016) te vrstama *Cucumis sativus* (Kim i sur., 2012) i *Ricinus communis* (Yasur i rani, 2013), gdje je zabilježeno povećanje aktivnosti enzima PPX nakon tretmana s  $\text{AgNO}_3$  u usporedbi s tretmanima s AgNP. Detektirane su i dvije izoforme enzima, PPX1 i PPX2, u gelu nakon oba tretmana, a imunodetekcijom proteina HRP otkrivene su 4 proteinske vrpce nakon tretmana s AgNP (HRP1-4), dok je nakon izlaganja ionskom srebru zabilježena samo jedna vrpca, HRP3. Rezultati imunodetekcije u suprotnosti su s rezultatima

aktivnosti PPX, što bi se moglo pripisati slabom kvalitetom membrane dobivene nakon prijenosa proteina i detekcije proteina HRP u uzorcima tretiranim s  $\text{AgNO}_3$  te bi se ovaj dio istraživanja svakako trebao ponoviti.

Što se tiče listova, aktivnost PPX porasla je pri koncentraciji od 50 i 75  $\mu\text{M}$  nakon tretmana s  $\text{AgNO}_3$ , nakon čega je pala na kontrolne vrijednosti. Pad aktivnosti PPX zabilježen je i nakon izlaganja 100 i 500  $\mu\text{M}$  AgNP. Ipak, aktivnost PPX u gelu pokazala je pojačane izoforme, njih sedam, koje nisu bile jednakog intenziteta pri svim ispitivanim koncentracijama AgNP i  $\text{AgNO}_3$ , dok je imunodetekcija s protutijelom anti-HRP otkrila dvije vrpce nakon oba tretmana. Slična opažanja u aktivnosti PPX zabilježena su u istraživanjima na listovima pelargonije (Hatami i Ghorbanpour, 2013).

Tretmani s AgNP i  $\text{AgNO}_3$  pokazali su sličan utjecaj na aktivnost antioksidacijskog enzima APX u korijenju. Pri nižim koncentracijama zabilježene su vrijednosti jednake kontrolnim vrijednostima no, nakon što su biljke izložene koncentracijama od 100 i 500  $\mu\text{M}$  AgNP i  $\text{AgNO}_3$  aktivnost je značajno pala ispod kontrolne vrijednosti, što je bilo izraženije u tretmanima s AgNP u odnosu na  $\text{AgNO}_3$ . Dobiveni rezultati ne odstupaju od rezultata imunodetekcije, gdje je uočena samo jedna izoforma čija ekspresija je u odnosu na kontrolu bila slabija nakon tretmana s višim koncentracijama AgNP i  $\text{AgNO}_3$ , što potvrđuje pad razine aktivnosti APX pri višim koncentracijama. Na gelu su uočene 4 izoforme enzima APX koje po svom intenzitetu također ne odstupaju od rezultata dobivenih mjerenjem aktivnosti APX jer intenzitet vrpce slabi s povećanjem koncentracije AgNP i  $\text{AgNO}_3$ . Cvjetko i sur. (2017) u svom istraživanju su također zabilježili pad aktivnosti APX u korijenu *Allium cepa* tretiranim s AgNP i  $\text{AgNO}_3$ , što je također bilo više izraženo nakon izlaganja korijena tretmanu s AgNP.

U listovima duhana nije zabilježena promjena aktivnosti APX nakon tretmana s AgNP i  $\text{AgNO}_3$ , što je u korelaciji sa rezultatima sadržaja ROS. Analizom gelova detektirano je osam izoformi APX-a različitog intenziteta, a jedino je vrpca APX8 bila jednakog intenziteta u svim tretmanima. Imunodetekcijom je uočena ekspresija tri proteinske vrpce APX od kojih su APX1 i APX3 bili jasno vidljivi samo u tretmanima sa 100 i 500  $\mu\text{M}$  AgNP i 500  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , dok su kod ostalih tretmana bile prisutne kao blijede vrpce. To sugerira pojačanu ekspresiju pojedinih izoformi APX kod jačeg stresa. Rezultati dobiveni imunodetekcijom nisu u skladu sa spektrofotometrijski izmjerenom aktivnosti, iako su u tretmanima s AgNP izmjerene povećane aktivnosti APX u odnosu na kontrolu, ali nisu bile statistički značajne. Povećanje aktivnosti APX zabilježeno je u listovima pelargonije (Hatami i Ghorbanpour, 2013) i jagode (Qin i sur., 2005) nakon izlaganja nanočesticama srebra.

Nakon izlaganja nanočesticama srebra, u korijenju biljaka duhana zabilježila sam statistički značajno povećanje aktivnost CAT pri nižim koncentracijama, dok je pri višim

koncentracijama aktivnost pala. Isti trend primijetila sam i nakon izlaganja ionskom srebru, iako su pri odgovarajućim tretmanima s nanočesticama srebra zabilježene veće vrijednosti. Rezultati su u skladu s detekcijom izoformi CAT u gelu gdje je uočen pojačan intenzitet sve tri izoforme CAT pri nižim koncentracijama oba tipa tretmana, što je bilo jače izraženo nakon tretmana s AgNP u odnosu na AgNO<sub>3</sub>. To je potvrđeno i imunodetekcijom primjenom protutijela anti-CAT. Povećanje aktivnosti katalaze zabilježeno je i u vrsti *Spirodela polyrhiza* nakon tretmana s AgNP (Jiang i sur., 2014), a pokazano je i da nanočestice ZnO izazivaju povećanu aktivnost CAT u vrsti *Prosopis velutina* (Hernandez-Viezcas i sur., 2011). S druge strane, Cvjetko i sur. (2017) uočili su pad aktivnosti CAT-a nakon tretmana s većim koncentracijama AgNP i AgNO<sub>3</sub> u korijenu luka (*A. cepa*). U listovima duhana zabilježeni su suprotni odgovori u aktivnosti CAT u odnosu na korijen; aktivnost se smanjila nakon svih tretmana s AgNP, dok su tretmani s AgNO<sub>3</sub> rezultirali nepromijenjenom aktivnošću pri 25 i 50 µM, povećanom aktivnošću pri 75 µM te padom pri 100 i 500 µM. Imunodetekcijom proteina CAT uočene su dvije vrpce u tretmanu s AgNP, dok je u tretmanu s AgNO<sub>3</sub> uočena samo jedna vrpca. Vrpce su imale jači intenzitet s porastom koncentracije što bi značilo da smanjenjem aktivnosti CAT dolazi do jače ekspresije vrpce pri višim koncentracijama. Smanjena aktivnost CAT uočena je u listovima kukuruza (Zhao i sur., 2012) i graška (Mukherje i sur., 2014) nakon izlaganja nanočesticama ZnO.

Promjene u aktivnosti antioksidacijskih enzima sugeriraju da su biljke izložene djelovanju AgNP pod stresom, iako parametri oksidacijskog stresa to ne pokazuju. Pad u aktivnosti antioksidacijskih enzima koji je uočen pri višim koncentracijama AgNP i AgNO<sub>3</sub> ukazuje na jaki stres kojem je izložen korijen duhana. Povećanje aktivnosti antioksidacijskih enzima događa se kada je biljka pod blagim stresom protiv kojeg se uspješno može boriti, dok konstantan ili jaki stres uzrokuje smanjenje aktivnosti kao što navode Qian i sur. (2013) u svom istraživanju na biljci *Arabidopsis*.

Nakon tretmana s AgNP i AgNO<sub>3</sub> uočila sam i promjene u ekspresiji topivih proteina, od kojih su neki bili pojačano eksprimirani, a drugi smanjene ekspresije, i u korijenu i u listu. Promjene u ekspresiji proteina koje sam uočila mogle bi se objasniti kao odgovor biljaka na oksidacijski stres jer razlike u ekspresiji pojedinih proteina mogu biti odgovor stanice na uvjete kojima je izložena (Moon i sur., 2003; Vranova i sur., 2002). Ovi različito eksprimirani proteini bi se dalje trebali analizirati spektrometrijom masa kako bi se pretraživanjem baza podataka pomoću njihovih sekvenci došlo do pouzdane informacije o kojim se točno proteinima radi i koje su njihove uloge u biljnoj stanici.

**ZAKLJUČAK**

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih istraživanja može se zaključiti slijedeće:

- 1.) Tretmani s AgNP nisu izazvali pojavu oksidacijskog stresa u korijenu i listu duhana prema ispitanim parametrima.
- 2.) Tretmani s AgNO<sub>3</sub> izazvali su pojavu oksidacijskog stresa u korijenu biljaka duhana prema svim ispitanim parametrima, a u listu prema većini parametara, što je osobito izraženo pri najvećim ispitanim koncentracijama.
- 3.) Promjene u aktivnosti i ekspresiji antioksidacijskih enzima veće su u korijenju i listovima duhana nakon izlaganja tretmanima s AgNO<sub>3</sub> u odnosu na AgNP.
- 4.) Ionsko srebro (AgNO<sub>3</sub>) pokazalo je veću toksičnost za biljke duhana od nanosrebra (AgNP).
- 5.) Učinci tretmana s AgNP i AgNO<sub>3</sub> bili su veći u korijenju nego u listovima biljaka duhana.



**POPIS LITERATURE**

## 7. POPIS LITERATURE

Aebi M (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105:121–126.

Ahmad P, Jaleel CA, Salem MA, Nabi G, Sharma S (2010) Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(3):161-175.

Anjum NA, Gill SS, Duarte AC, Pereira E, Ahmad I (2013) Silver nanoparticles in soil–plant systems. *Journal of Nanoparticle Research*, 15:1896.

Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 82:1227–1234.

Alscher RG, Erturk N, Heath, L.S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372):1331-1341.

Aslani F, Juraimi S (2014) Effects of engineered nanomaterials on plants growth: an overview. *The Scientific World Journal*, Volume 2014, Article ID 641759.

Balasubramanyam M, Adaikalakoteswari A, Sameermahmood Z, Mohan V (2010) Biomarkers of oxidative stress: methods and measures of oxidative DNA damage (COMET assay) and telomere shortening. *Methods in Molecular Biology*, 610:245-61

Balen B, Tkalec M, Sikić S, Tolić S, Cvjetko P, Pavlica M, Vidaković-Cifrek Z (2011a) Biochemical responses of *Lemna minor* experimentally exposed to cadmium and zinc. *Ecotoxicology*, 20(4):815-826.

Balen B, Pavoković D, Peharec Štefanić P, Krsnik-Rasol M (2011b) Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. Zagreb. Sveučilišni priručnik, Hrvatska sveučilišna naklada.

Barbasz A, Kreczmer B, Ocwieja M (2016) Effects of exposure of callus cell of two wheat varieties to silver nanoparticles and silver salt (AgNO<sub>3</sub>). *Acta Physiologiae Plantarum*, 38:76

Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1):276-287.

Benowitz NL (2010) Nicotine addiction. *The New England Journal of Medicine*, 362(24):2295-2303.

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8:93-99.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.

Brar DS, Khush GS (1994) Cell and tissue culture for plant improvement. U: Basra AS (ur.) Mechanisms for plant growth and improved productivity – Modern approaches. New York, Mercel Dekker INC, 229-278.

Castegna A, Drake J, Pocernich C, Butterfield DA (2003) Protein carbonyl levels-An assessment of protein oxidation. U: Hensley K, Floyd RA (ur.) Methods in Pharmacology and Toxicology: Methods in Biological Oxidative Stress. Totowa, Human Press Inc., pp 161-168.

Caverzan A, Passaia G, Rosa SB, Ribeiro CW, Lazzarotto F, Margis-Pinheiro M (2012) Plant response to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. Genetics and Molecular Biology, 35(4):1011-1019.

Chance B, Maehly AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. In: Colowick SP, Kaplan NO (eds) Methods in Enzymology, pp 764–775.

Choi O, Deng KK, Kim NJ, Ross L Jr, Surampalli RY, Hu Z (2008) The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions and silver chloride colloids on microbial growth. Water Research, 42(12):3066-3074.

Cvjetko P, Balen B, Peharec Štefanić P, Debogović L, Pavlica M, Klobučar GIV (2014) Dynamics of heat-shock induced DNA damage and repair in senescent tobacco plants. Biologia Plantarum, 58(1):71-79.

Cvjetko P, Milošić A, Domijan AM, Vinković Vrček I, Tolić S, Peharec Štefanić P, Letofsky-Papst I, Tkalec M, Balen B (2017) Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. Ecotoxicology and Environmental Safety 137, 18-28.

Domijan AM, Abramov AY (2011) Fumonisin B1 inhibits mitochondrial respiration and deregulates calcium homeostasis--implication to mechanism of cell toxicity. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 43(6):897-904.

Flick CE, Evans DA (1984) Tobacco. U: Sharp WR, Evans DA, Ammirato PV, Yamada Y (ur.) Hand book of plant cell culture. London, Collier Macmillan Publishers, pp 606-630.

Ganapathi TR, Suprasanna P, Rao PS, Bapat VA (2004) Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) – A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. Indian Journal of Biotechnology, 3:171-184.

Geisler-Lee J, Brooks M, Gerfen JR, Wang Q, Fotis C, Sparer A, Ma X, Berg RH, Geisler M (2014) Reproductive toxicity and life history study of silver nanoparticle effect, uptake and transport in *Arabidopsis thaliana*. Nanomaterials, 4(2):301-318.

Gichner T, Patková Z, Száková J, Demnerova K (2004) Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. Mutation Research, 559(1-2):49-57.

Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, 48(12):909-930.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford.

Hatami M, Ghorbanpour M (2013) Effect of nanosilver on physiological performance of Pelargonium plants exposed to dark storage. Journal of Horticultural Research 21(1):15-20.

Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics, 125:189-198.

Hernandez-Viezcas JA, Castillo- Michel H, Servin AD, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL (2011) Spectroscopic verification of zinc absorption and distribution in the desert plant *Prosopis juliflora-velutina* (velvet mesquite) treated with ZnO nanoparticles. Chemical Engineering Journal, 170(1-3):346-352.

Hiraga s, Sasaki K, Ito H, Ohoshi Y, Matsui H (2001) A large family of class III plant peroxidases. Plant and Cell Physiology, 42:462-468.

Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ (2008) The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. Toxicology Letters, 179(3):130-139.

Inze D, Montagu MV (2003) Oxidative Stress in Plants. CRC Press, Boca Ration, London.

Jiang HS, Qiu XN, Li GB, Li W, Yin LY (2014) Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *Spirodela polyrhiza*. Environmental Toxicology and Chemistry, 33(6):1398-1405.

Kim S, Lee S, Lee I (2012) Alteration of phytotoxicity and oxidant stress potential by metal oxide nanoparticles in *Cucumis sativus*. Water, Air & Soil Pollution, 223:2799-2806.

Kumari M, Mukherjee A, Chandrasekaran N (2009) Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. Science of the Total Environment, 407:5243-5246.

Labudda M (2013) Lipid peroxidation as a biochemical marker for oxidative stress during drought. An effective tool for plant breeding. E-wydawnictwo.eu, Poland.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227:680-685.

Lansdown AB (2002) Silver I: Its antibacterial properties and mechanism of action. Journal of Wound Care, 11:125-130.

Levard C, Hotze EM, Lowry GV, Brown GE Jr. (2012) Environmental Transformations of Silver Nanoparticles; Impact on Stability and Toxicity. Environmental Science Technology, 46(13):6900-6914.

Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E (1994) Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins. Methods in Enzymology, 233:346-357.

Mijović B (2015) Nano – mnoštvo rizika i koristi. Sigurnost, 57(3):205-209.

Milošić A (2014) Utjecaj čestica nanosrebra na rast i pojavu oksidacijskog stresa u korjenčićima luka (*Allium cepa* L.). Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Mithöfer A, Schultze B, Boland W (2004) Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. FEBS Letters, 566:1–5.

- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7:405-410.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9:490-498.
- Mittler R, Zilinskas BA (1993) Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Analytical Biochemistry*, 212:540-546.
- Moon H, Lee B, Choi G, Shin D, Prasad DT, Lee O, Kwak SS, Kim DH, Nam J, Bahk J, Hong JC, Lee SY, CHO MJ, Lim CO, Yun DJ (2003) NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(1):358-63.
- Mukherjee A, Peralta-Videa JR, Bandyopadhyay S, Rico CM, Zhao L, Gardea-Torresdey JL (2014) Physiological effect of nanoparticulate ZnO in green peas (*Pisum sativum* L.) cultivated in soil. *Metallomics*, 6(1):132-138.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15:473–479.
- Nair PM, Chung IM (2014a) Assessment of silver nanoparticle-induced physiological and molecular changes in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Science and Pollution Research International*, 21(14):8858-8869.
- Nair PM, Chung IM (2014b) Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere*, 112:105-113.
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22:867–880.
- Nowack B, Bucheli TD (2007) Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, 50:5-22.
- Qian H., Peng X, Han X, Ren J, Sun L, Fu Z (2013) Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ion on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *Journal of environmental sciences*, 25(9):1947-1956.
- Qin Y, Zhang S, Zhang LM, Zhu D, Syed A (2005) Response of *in vitro* strawberry to silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>). *Horticultural Science*, 40:747-751.
- Rogić T, Horvatić A, Tkalec M, Cindrić M, Balen B (2015) Proteomic analysis of *Mammillaria gracilis* Pfeiff. *in vitro*-grown cultures exposed to iso-osmotic NaCl and mannitol. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 122(1):127-146.
- Salopek-Sondi B, Sondi I (2004) Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(1):177-82.

Sellers K, Mackay C, Bergeson LL, Clough SR (2009) Nanotechnology and the Environment. CRC Press, Boca Ration, London – New York.

Seltenrich N (2013) Nanosilver: Weighing the risks and benefits. Environmental Health Perspectives, 121:220-225.

Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miygawa Y, Takeda T, Yabut Y, Yoshimura K (2002) Regulation and function of ascorbat peroxidase izoenzymes. Journal of Experimental Botany, 53:1305-1319

Shtangeeva I, Venäläinen S, Hartikainen H, Surgik M, Timofeev S (2011) Silver-induced changes in the nutrient and trace element uptake by wheat and amount of the rhizosphere proteins. Journal of Plant Nutrition, 34:1497-1506.

Sies H (1985) Oxidative stress, introductory remarks. U: Sies H (ur.) Oxidative Stress. London, Academic Press, 1-8.

Stampoulis D, Sinha SK, White JC (2009) Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. Environmental Science and Technology, 43:9473-9479.

Tkalec M, Štefanić PP, Cvjetko P, Šikić S, Pavlica M, Balen B (2014) The effects of cadmium-zinc interactions on biochemical responses in tobacco seedlings and adult plants. PLoS ONE, 9(1): e87582.

Tran QH, Nguyen VQ, Le A-T (2013) Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, Vol. 4, No. 3.

Vannini C, Domingo G, Onelli E, De Mattia F, Bruni I, Marsoni M, Bracale M (2014). Phytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles exposure on germinating wheat seedlings. Journal of Plant Physiology, 171(13):1142-1148.

Vranová E, Inzé D, Van Breusegem F (2002) Signal transduction during oxidative stress. Journal of Experimental Botany, 53(372):1227-1236.

Wang Z, Xie X, Zhao J, Liu X, Feng W, White JC, Xing B (2012) Xylem- and phloem-based transport of CuO nanoparticles in maize (*Zea mays* L.), Environmental Science and Technology, 46(8):4434-4441.

Woodbury WA, Spencer K, Stahlmann MA (1971) An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. Analytical Biochemistry 44:301-305.

Yasur J, Rani PU (2013) Environmental effects of nanosilver: impact on castor seed germination, seedling growth, and plant physiology. Environmental Science and Pollution Research, 20:8636-8648.

Yin L, Cheng Y, Espinasse B, Colman BP, Auffan M, Wiesner M, Rose J, Liu J, Bernhardt ES (2011) More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. Environmental Science and Technology, 45(6):2360-2367.

Zhao L, Peng B, Hernandez-Viescas JA, Rico C, Sun Y, Peralta-Videa JR, Tang X, Niu G, Jin L, Varela-Ramirez A, Zhang J, Gardea-Torresdey JL (2012). Stress response and

tolerance of *Zea mays* to CeO<sub>2</sub> nanoparticles: Cross talk among H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, heat shock protein, and lipid peroxidation. ACS Nano, 6:9615-9622

<http://nanodb.dk/en/nanoriskcat/> (10.12.2016.)

<http://nanodb.dk/en/search-database> (10.12.2016.)

<http://www.nanopartikel.info/en/denmark/1026-nano-database-en> (10.12.2016.)

## **ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 24. kolovoza 1989. godine u Zagrebu, gdje sam završila Osnovnu školu Retkovec i Gornjogradsku gimnaziju. 2008. godine sam upisala integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. U tijeku studija odradila sam metodičku praksu iz biologije u Osnovnoj školi Sesvetska Sela dok sam metodičku praksu iz kemije odradila u V. gimnaziji u Zagrebu, gdje sam stekla iskustvo rada s učenicima. Na fakultetu sam sudjelovala 2011. i 2014. godine u organizaciji i izvedbi edukativno-zabavne manifestacije pod nazivom „Noć biologije“ kojoj je cilj promicati znanost. Izvan fakulteta radila sam u kazalištu Kerempuh i Vidra gdje sam stekla iskustvo rada sa osobama s invaliditetom.